



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de
la República (PROPAC)

**“Incidencia y comportamiento de *Salmonella* spp. y
Listeria monocytogenes en queso ranchero”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

PRESENTA

Q.F.B. José Eduardo Lucero Mejía

DIRIGIDO POR

Dra. Sofía María Arvízu Medrano

Santiago de Querétaro, Querétaro, Noviembre de 2016.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química.

Programa de Posgrado del Centro de la República (PROPAC)
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

"Incidencia y comportamiento de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en queso ranchero"

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Q.F.B. José Eduardo Lucero Mejía

Dirigido por:

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Presidente

Firma

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Secretario

Firma

Dr. Michael J. Miller
Vocal

Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Suplente

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Suplente

Firma

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro
Noviembre, 2016

1. RESUMEN

El queso ranchero es un alimento que por sus características físicas y químicas: pH cercano a la neutralidad, alta actividad de agua (A_w), bajo contenido de sal y rico en nutrientes, podría propiciar el desarrollo de microorganismos como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. Estos dos microorganismos han sido causantes de un número importante de brotes en Estados Unidos asociados al consumo de queso, fresco. En este trabajo se investigó en el queso ranchero la presencia de éstos dos patógenos, y se cuantificó el contenido de: bacterias lácticas, enterobacterias, coliformes totales y fecales, *E. coli*, mohos y levaduras; y parámetros como, pH, contenido de sal y A_w . Se evaluó el comportamiento de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* a diferentes temperaturas 4 y 22°C en queso ranchero ajustado a niveles seleccionados de pH (5.6 y 7) y concentración de NaCl (1.5, 2.5 y 3.5%). Adicionalmente, se evaluó una condición dinámica de temperatura (4°C/12 h, 22°C/8h y 30°C/ 4 h, 3 ciclos). El queso ranchero proveniente de supermercados^a y mercados públicos^b, mostraron una concentración similar en BAL (6.69^a y 6.78^b Log UFC/g), en contraste con los niveles de hongos (1.0^a y 2.0^b Log UFC/g), levaduras (3.63^a y 4.05^b Log UFC/g), Enterobacteriaceae (2.32^a y 5.85^b Log UFC/g), coliformes totales (1.95^a y 3.77^b Log UFC/g), coliformes fecales (1.95^a y 2.26^b Log UFC/g) y *E. coli* (1.95^a y 2.10^b Log UFC/g), que muestran diferencia significativa entre sitios de comercialización. *Salmonella* y *L. monocytogenes* se detectaron en 14 (9.30%), y 3 (2.0%) muestras, respectivamente. Las características físicas y químicas mostrarán amplia dispersión: pH (4.87-6.87), A_w (0.813-0.999), %ácido láctico (0.08-0.52), %NaCl (0.53-4.25). A 4°C el pH es el factor que tiene mayor influencia en el comportamiento de los dos patógenos, observándose en ambos una tendencia a la inactivación, en particular a pH 5. A 22°C, *Salmonella* desarrolló, siendo la concentración de NaCl el factor que tiene mayor impacto; en el comportamiento de *L. monocytogenes* tanto el pH como la concentración de NaCl mostraron influencia, en el comportamiento de los patógenos, el cual fue desde desarrollo hasta una clara inactivación. Durante el almacenamiento en temperaturas dinámicas, se observó que *Salmonella* muestra la habilidad para desarrollar, mientras que, *L. monocytogenes* se inhibe, probablemente por la actividad de las BAL. En conclusión el queso ranchero es una matriz que puede soportar el desarrollo de los patógenos estudiados, cuando las condiciones de pH, concentración de NaCl y actividad metabólica de la microbiota lo permitan; el desarrollo de los patógenos, incrementa el riesgo que representa su consumo.

Palabras clave: Queso ranchero, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.

1. SUMMARY

Ranchero cheese is a product which could lead microbial growth of microorganisms, such as *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*, for its characteristics: pH near to neutrality, high water activity (A_w), low salt content and nutrient richness. In United States, these pathogens have been associated to many outbreaks linked to fresh cheese. In this work lactic acid bacteria (LAB), enterobacteria, total and fecal coliforms, *E. coli*, molds and yeasts, pH, A_w , acidity and salt content were quantified; as well as the presence of *Salmonella* and *L. monocytogenes* was investigated. Behavior of *Salmonella* and *L. monocytogenes* at 4 and 22°C, pH levels of 5, 6 and 7 and salt concentration levels of 1.5, 2.5 and 3.5%, was evaluated. Additionally a dynamic temperature condition (4°C/12 h, 22°C/8h y 30°C/ 4 h, 3 cycles) was assessed. Ranchero cheese from supermarkets^a and public markets^b, showed a similar LAB concentration (6.69^a and 6.78^b Log CFU/g), in contrast to levels of molds (1.0^a and 2.0^b Log CFU/g), yeasts (3.63^a and 4.05^b Log CFU/g), Enterobacteriaceae (2.32^a and 5.85^b Log CFU/g), total coliforms (1.95^a and 3.77^b Log CFU/g), fecal coliforms (1.95^a and 2.26^b Log CFU/g) and *E. coli* (1.95^a and 2.10^b Log CFU/g) showing a significant difference between retail point. *Salmonella* and *L. monocytogenes* were detected in 14 (9.3%), and 3 (2.0%) samples, respectively. The physical and chemical characteristics of ranchero cheese showed a wide dispersion: pH (4.87-6.87), A_w (0.813-0.999), %lactic acid (0.08-0.52), %NaCl (0.53-4.25). At 4°C, pH level is the factor that has more influence on the behavior of the both pathogens, showing a clear tendency to inactivation. At 22°C, *Salmonella* was able to grow, the NaCl concentration was the factor with a major influence, regarding *L. monocytogenes* both pH and NaCl content have an influence in their behavior, which can range from development to pronounced inactivation. Finally at dynamic temperature condition *Salmonella* was able to grow whereas, *L. monocytogenes* was inhibited, probably by LAB activity. In conclusion ranchero cheese is food able to support pathogens growth if pH level, NaCl concentration and microbiota activity are favorable; pathogens growth in this food becoming ranchero cheese a health risk food.

Key words: Ranchero cheese, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.

2. AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo brindado para realizar este posgrado.

Agradezco al **PROPAC** por aceptarme en el programa de maestría en ciencia y tecnología de los alimentos, a sus docentes quienes me ayudaron en esta nueva formación, también agradezco a Laurita y Carmelita quienes siempre tuvieron la disposición de apoyarnos en lo que necesitábamos.

Agradezco a quienes me dieron la oportunidad de llegar tan lejos: **mis padres**. Que en ningún momento me negaron el apoyo, desde que decidí estudiar la maestría hasta este momento, siempre cuento, conté y sé que puedo contar con ellos, en todos los ámbitos, agradezco a que me forjaran de la manera que lo han hecho, y por sus palabras que pese a la distancia me muestran su cariño incondicional, me han sabido levantar, y saber que debo seguir adelante. Agradezco poder tenerlos y por ello este logro se los dedico a ustedes.

Agradezco a **mi hermana Itzel**, que igual es una parte importante de mi vida, y que ha sido difícil dejar de estar cerca, pero que aun no estando juntos, me sigue mostrando su apoyo y cariño.

Agradezco al **Dr. Fausto Tejeda**, por confiar en mí, en alentarme en estudiar la maestría y creer en el profesional que he llegado a ser.

Agradezco a la **Dra. Sofía Arvizu**, por dejarme conocerla y ser mi guía en esta etapa, permitirme trabajar con usted, por confiar en mis conocimientos, dejarme experimentar, trabajar en conjunto mío y así desarrollarme como microbiólogo, por corregirme, por compartir sus conocimientos y experiencia, enriquecer mi trabajo, ayudarme a que no me desviara de los objetivos y de cómo lograrlo, creer en mí, y dejarme llegar tan lejos como fue posible.

Agradezco a la **Dra. Montserrat Hernández**, porqué al igual confió y creyó en mí, compartió sus conocimientos y me ayudo a forjarme en esta nueva etapa, así mismo agradezco el poder usar su laboratorio para el desarrollo del proyecto.

Agradezco a la **Dra. Silvia Amaya**, al **Dr. Mike Miller** y el **Dr. Eduardo Castaño**, miembros de mi comité quienes aportaron valiosas aportaciones al proyecto.

Agradezco a **Juan Carlos Aguilar**, mi amigo, mi aliado, quien me brindó su apoyo incondicional en innumerables días de trabajo, enriqueció mi trabajo con comentarios y preguntas, compartió tips en el laboratorio, me acompañó en este proceso arduo y difícil, supo darme ánimos cuando lo necesité, me ayudo a crecer y aprender tanto de mi como de él y supo aguantarme en los malos momentos, agradezco el sinfín de momentos agradables y difíciles que han sucedido y que ha podido estar ahí.

Agradezco a mis **compañeros de maestría**: Kalaumari, Ivan, Adriana, Reyna, Juan Pablo, Abril, Alexa, Azucena, Kenya, Alejandro, Celene, Karen, Pablo, Bety, Gaby, Fany, Angelica, Gina, Cecilia, Karina, Karla y Liz; con quienes comencé una etapa nueva y diferente, que me mostraron lo que puedo hacer o lo que no sabía que podía, aprendimos, convivimos, compartimos, competimos, reímos y quizá hasta discutimos, con algunos pude tener una amistad con otros no, pero al final cada quien aportó un granito de arena al otro y complementamos nuestra formación.

Agradezco a mis **compañeros del laboratorio** Omar Ayala, Carmen Gonzalez, Alex Aldrete y Dalia Miranda, con quienes compartí una relación de trabajo y pudimos intercambiar algunas experiencias y situaciones agradables en el lab. Alex Alcaraz, Abril Reyes y Pablo Márquez, con quienes tuve oportunidad de trabajar, desarrollar aptitudes personales, compartir experiencias y aprender de ellos y ayudarme a crecer.

Agradezco a la **Sra. Martha** quien me apoyo en la parte técnica en innumerables ocasiones, quien pese a la cantidad de trabajo que pudiera tener siempre tenía tiempo para apoyarme y que hacía de la hora del café un rato para olvidarse del mar de trabajo y poder convivir, también agradezco su apoyo moral y palabras de aliento.

Agradezco a las personas de servicio social o estancias quienes en algún momento pudieron apoyarme en mis experimentos y aligerar la carga de trabajo.

Agradezco a mis amigos **Carlos, Mayra, Omar, Ángel, Adriana**, que en los pasillos, laboratorios, y reuniones tuvimos la oportunidad de convivir, reírnos y apoyarnos, agradezco me hicieran huequillo en su generación.

Agradezco a mis amigos del club **Alma, Sofía, Gabino y Adán**, quienes aunque no son parte del posgrado, hicieron que este proceso tuviera otro sentido fuera de la universidad, pasando tantos momentos llenos de diversión y convivencia.

INDICE GENERAL

1. RESUMEN.....	3
1. SUMMARY	4
2. AGRADECIMIENTOS.....	5
INDICE DE FIGURAS	10
INDICE DE TABLAS	12
3. INTRODUCCIÓN.....	13
4. ANTECEDENTES.....	14
4.1 QUESOS FRESCOS.....	14
4.1.1 Definición y clasificación	14
4.1.2 Producción y consumo.....	15
4.1.3 Quesos como vehículos de microorganismos patógenos.....	15
4.2 MICROORGANISMOS PATÓGENOS TRANSMISIBLES POR QUESO	17
4.2.1 <i>Salmonella</i> spp	18
4.2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	19
4.3 COMPORTAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN LOS ALIMENTOS	20
4.3.1 Factores ecológicos que influyen en el desarrollo bacteriano en el queso. 22	
5. OBJETIVOS.....	24
4.1 Objetivo general	24
4.2 Objetivos específicos.....	24
6. MATERIALES.....	25
6.1 Equipos	25
6.2 Medios de cultivo	25

6.3	Reactivos.....	26
6.4	Material biológico	27
6.4.1	Cuajada de queso rancho.....	27
6.4.2	Cepas bacterianas	27
7.	METODOLOGÍA	28
7.1	Perfil microbiológico del queso rancho	28
7.1.1	Obtención de las muestras	28
7.1.2	Preparación de las muestras para su análisis microbiológico.....	29
7.1.3	Cuantificación de bacterias ácido lácticas (BAL)	29
7.1.4	Cuantificación de coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y <i>E. coli</i> por el método de número más probable (NMP).....	29
7.1.5	Cuantificación de mohos y levaduras	30
7.1.6	Detección de <i>Salmonella</i> spp.....	30
7.1.7	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	32
7.2	Características fisicoquímicas del queso rancho	33
7.2.1	Determinación de pH	33
7.2.2	Determinación de actividad de agua (<i>A_w</i>).....	33
7.2.3	Cuantificación de cloruro de sodio (% de NaCl).....	33
7.2.4	Determinación de acidez titulable	34
7.3	Comportamiento de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> en queso rancho: durante condiciones dinámicas de temperaturas y a diferentes niveles de pH y % de NaCl.....	34
7.3.1	Preparación y estandarización del inóculo.....	34
7.3.2	Modificación de los niveles de pH y % sal.	35
7.3.3	Inoculación del queso e incubación	36
7.3.4	Cuantificación de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> en queso rancho	36
7.3.5	Estimación de los parámetros cinéticos del comportamiento de los microorganismos en queso rancho	36
7.4	Análisis estadístico y diseño experimental.....	37
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
8.1	Perfil microbiológico del queso rancho	38
8.2	Incidencia de <i>Salmonella</i> spp. y <i>Listeria monocytogenes</i> en queso rancho.....	47
8.3	Características físicas y químicas del queso rancho	48

8.4 Comportamiento de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> en queso rancho	51
8.4.1 Comportamiento de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> en queso rancho durante condiciones dinámicas de temperatura.....	51
8.4.2 Comportamiento de <i>Salmonella</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> en queso rancho a diferentes niveles de pH y concentración de NaCl.....	58
8.4.3 Estimación de parámetros cinéticos del comportamiento de los microorganismos en queso rancho.....	70
9. CONCLUSIONES.....	72
10. REFERENCIAS.....	73

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Perfil de temperatura de las muestras de queso rancho al momento de su compra en mercados y supermercados.	39
2.	Contraste del contenido de BAL, mohos y levaduras de queso rancho provenientes de supermercado (a) y mercados públicos (b).	40
3.	Contraste del contenido de Enterobacterias, coliformes totales, coliformes fecales y <i>E. coli</i> de queso rancho provenientes de supermercado (a) y mercados públicos (b).	43
4.	Incidencia de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> en queso rancho colectado en mercados públicos y supermercados.	47
5.	Características físicas y químicas del queso rancho según su origen, S: supermercado, M: mercado público.	50
6.	Comportamiento de <i>Salmonella</i> a temperaturas dinámicas (4-7°C/12h, 22°C/8h, 30°C/4h) en queso rancho.	52
7.	Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> a temperaturas dinámicas (4-7°C/12h, 22°C/8h, 30°C/4h) en queso rancho.	53
8.	Comportamiento de BAL bajo condiciones dinámicas de temperatura (4-7°C/12h, 22°C/8h, 30°C/4h) en queso rancho.	54
9.	pH del queso rancho almacenado en temperaturas dinámicas (4-7°C/12h, 22°C/8h, 30°C/4h)	55
10.	Porcentaje de ácido láctico del queso rancho almacenado en condiciones dinámicas de temperatura (4-7°C/12h, 22°C/8h, 30°C/4h)	55
11,	Comportamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> a temperaturas dinámicas (4-7°C/12h, 22°C/8h, 30°C/4h) en queso rancho (Replica 3).	56
12.	Comportamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> a temperaturas dinámicas (4-7°C/12h, 22°C/8h, 30°C/4h) en queso rancho (Replica 1)	57
13.	Comportamiento de <i>Salmonella</i> en queso rancho a diferentes condiciones de pH y % de NaCl almacenadas a 4°C	58
14.	Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> en queso rancho a diferentes condiciones de pH y % de NaCl almacenadas a 4°C	59
15.	Comportamiento de <i>Salmonella</i> en queso rancho a diferentes condiciones de pH y % de NaCl almacenadas a 22°C	61
16,	Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> en queso rancho a diferentes condiciones de pH y % de NaCl almacenadas a 22°C	63
17.	Comportamiento de BAL y <i>Salmonella</i> en queso rancho a diferentes condiciones de pH y % de NaCl almacenadas a 4°C	64
18.	Comportamiento de BAL y <i>L. monocytogenes</i> en queso rancho a diferentes condiciones de pH y % de NaCl almacenadas a 4°C	65

19.	Comportamiento de BAL y <i>Salmonella</i> en queso ranchero a diferentes condiciones de pH y % de NaCl almacenadas a 22°C	67
20.	Comportamiento de BAL y <i>L. monocytogenes</i> en queso ranchero a diferentes condiciones de pH y % de NaCl almacenadas a 22°C	67
21.	pH y acidez del queso ranchero, a lo largo de la cinética a 4°C	69
22.	pH y acidez del queso ranchero, a lo largo de la cinética a 22°C	69

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Incidencia de patógenos en quesos frescos en México	17
2. Factores ecológicos que afectan la sobrevivencia y desarrollo microbiano en los alimentos.	21
3. Número de muestras por mercado público.....	28
4. Iniciadores para la identificación del gen <i>InvA</i> en <i>Salmonella</i>	31
5. Iniciadores para la identificación del gen <i>Hly</i> en <i>Listeria monocytogenes</i>	32
6. Valores p de las diferencias en las medianas del contenido de BAL, mohos y levaduras en queso ranchero obtenido en mercado y supermercado (Kruskal-Wallis).....	42
7. Valores p de las diferencias en las medianas del contenido de Enterobacterias, coliformes totales, fecales y <i>E. coli</i> en queso ranchero obtenido en mercado y supermercado (Kruskal-Wallis).	45
8. Características físicas y químicas de quesos rancheros	49
9. Valores p de las diferencias en las medianas del pH, acidez, %NaCl y Aw en queso ranchero obtenido en mercado y supermercado (Kruskal-Wallis).....	51

3. INTRODUCCIÓN

En México se producen más de 30 variedades de quesos, los cuales en su mayoría son clasificados dentro de los quesos frescos, siendo estos los que generalmente consume la población mexicana.

Los quesos frescos pueden ser elaborados de manera artesanal o industrial, son comercializados en mercados públicos y supermercados, siendo los más consumidos el queso panela, tipo Oaxaca y ranchero. Es importante monitorear el proceso de elaboración y las condiciones de almacenamiento, para implementar medidas correctivas y asegurar la inocuidad del alimento.

En México al no tener un sistema de vigilancia para rastrear los brotes de enfermedad producidos por patógenos asociados a alimentos, se toma como referencia la información generada en otros países. En Estados Unidos, en donde se ha reportado que en quesos frescos los principales patógenos asociados a estos brotes son *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*

La presencia de estos patógenos cobra importancia debido a que la composición del queso ranchero (contenido de nutrientes, pH y actividad de agua), hacen de este alimento una matriz que propicia el desarrollo microbiano.

Sin embargo, la composición del alimento puede variar, generando diversos escenarios en cuanto a la concentración de NaCl y pH, por ejemplo, que afecten el comportamiento de los patógenos.

Por ello el objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en función de la temperatura de almacenamiento y las características asociadas a la composición del queso ranchero.

4. ANTECEDENTES

4.1 QUESOS FRESCOS

4.1.1 Definición y clasificación

El queso es un alimento de amplio consumo a nivel mundial, cuyas características de composición, texturales, sensoriales son muy diversas. (Rámirez, 2012).

Según la NOM-243-SSA1-201, se puede definir un queso como producto elaborado de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior, por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado.

En cuanto a los quesos frescos la NOM-243-SSA1-2010 dice que se consideran como quesos frescos aquellos que además de cumplir con la descripción general de queso se caracterizan por su alto contenido de humedad, y por no tener corteza o tener corteza muy fina, pudiendo o no adicionarles aditivos e ingredientes opcionales.

Dentro de la clasificación de quesos frescos encontramos:

- a) Frescales: Panela, Canasto, Sierra, Ranchero, Fresco, Blanco, Enchilado, Adobado
- b) De pasta cocida: Oaxaca, Asadero, Mozzarella, Del Morral, Adobera

Acidificados: Cottage, Crema, Doble crema, Petit Suisse, Neufchatel

4.1.2 Producción y consumo

Actualmente, en el mercado nacional de quesos domina la producción de quesos frescos (Villegas, 2011). Existen más de 30 variedades de quesos cuya elaboración está más o menos extendida en todo el país, cada tipo de queso se diferencia de los otros tipos en su composición y propiedades fisicoquímicas, así como la variabilidad sensorial (García, 2006).

Al hablar de quesos frescos y sobre todo quesos frescos mexicanos, se tiene que resaltar que existen sectores en la población donde estos se elaboran de manera artesanal, y cuando este es el caso frecuentemente el producto se elabora con leche auténtica cruda y con procesos tradicionales, a diferencia de la industria. Generalmente, estos quesos son de circulación local o regional, tienen como nichos de mercado a consumidores de esos mismos espacios geográficos y recientemente, a una creciente población de clientes que busca productos de calidad con evocación de lo tradicional y genuino, pero respetando las tradiciones locales y el medio ambiente (Villegas, 2011).

El panorama actual de la industria de quesos en nuestro país es que se produjeron 62 345 toneladas de queso ranchero (el 17.16% del total de la producción de quesos) en 2015, y 10 201 (17.29% del total de la producción de quesos) en el periodo de enero a marzo d 2016 (SAGARPA, 2016).

4.1.3 Quesos como vehículos de microorganismos patógenos

Los quesos son alimentos listos para el consumo, es decir, no se someten a ningún tratamiento adicional que pueda asegurar la inocuidad del producto antes de su consumo. La contaminación de queso con patógenos puede ocurrir en varias etapas, por lo que se debe tener un control estricto en ciertos puntos de la producción (Kousta, 2010), almacenamiento, distribución y durante su venta. La pasteurización elimina a los microorganismos patógenos del alimento, a no ser que ésta sea ineficiente o no aplicada de manera correcta, y con productos no pasteurizados sigue existiendo la posibilidad de tener algún microorganismo

patógeno (Langer, 2012), y es la situación de algunos quesos que son elaborados de manera artesanal en nuestro país.

Según Gould *et al* (2014), los brotes en Estados Unidos presentados de 1998 al 2011 relacionados con quesos llegan a un total de 90 y pueden agruparse en: 1) donde se implicaron quesos elaborados con leche no pasteurizada donde los patógenos involucrados fueron: *Salmonella* (34%), *Campylobacter* (26%), *Brucella* (13%), *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga (11%), *Listeria monocytogenes* (11%), y 2) donde se implicaron quesos elaborados con leche pasteurizada donde los patógenos involucrados fueron: Norovirus (39%), *Listeria monocytogenes* (24%), *Salmonella* (18%), *Campylobacter* (3%), *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga (3%). Así mismo este reporte señala que los quesos involucrados en dichos brotes son en su mayoría de los clasificados como quesos no madurados, de los cuales el queso fresco fue involucrado en el 53% de los brotes, los distintos quesos frescos mexicanos (agrupados así por ser del mismo origen pero por la diversidad de quesos existentes) fueron asociados en un 20% de los brotes; otro dato interesante es que el 38% de los quesos involucrados en estos brotes fueron importados de México.

En nuestro país, el sistema de vigilancia de enfermedades asociadas a los alimentos no está consolidado para hacer el estudio o la rastreabilidad de brotes de manera sistemática, sólo cuenta con una estadística epidemiológica sobre algunos padecimientos frecuentes en el país, dentro de estos hay un apartado de intoxicaciones alimentarias y algunos otras enfermedades gastrointestinales que pudieran o no ser causados por ingestión de alimentos contaminados.

Así mismo la información sobre la incidencia de los patógenos en quesos en nuestro país es escasa y en ocasiones no es suficiente, una recopilación de los diversos trabajos realizados en el país muestra que los principales patógenos encontrados en el queso son: *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (O:157H:7 o no) y *Listeria monocytogenes* (Guzmán-Hernández, *et al*, 2011; Torres-Vitela *et al*, 2012; Avelino, *et al*, 2013; Hernández, 2013; Ayala-López *et al*, 2014; Padilla *et al*, 2014), (Tabla1).

Tabla 1 Incidencia de patógenos en quesos frescos en México

Tipo de queso	Patógeno	Incidencia (muestras positivas, % en el estudio)	Fuente
Queso panela	<i>Salmonella</i> spp	34 (17%)	Torres-Vitela <i>et al.</i> , 2012
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	16 (8%)	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	6 (3%)	
	Enterotoxina estafilococcica	0	
Queso adobera	<i>Salmonella</i> spp	20 (10%)	Torres-Vitela <i>et al.</i> , 2012
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	4 (2%)	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	12 (6%)	
	Enterotoxina estafilococcica	0	
Quesos frescos*	<i>Salmonella</i> spp	2 (4%)	Guzmán-Hernández, <i>et al.</i> , 2011
	<i>Staphylococcus aureus</i>	17(33%)	Guzmán-Hernández, <i>et al.</i> , 2011
		40 (37)	Padilla <i>et al.</i> , 2014
		40 (100%)	Hernández, 2013
Quesos frescos no pasteurizados	<i>Salmonella</i> spp	13 (27%)	Avelino, <i>et al.</i> , 2013
	<i>Staphylococcus aureus</i>	11 (23%)	
Quesos a lo largo de procesos de producción	<i>Salmonella</i> spp	4 (1.5%)	Ayala-López <i>et al.</i> , 2014
	<i>Staphylococcus aureus</i>	8	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0	

*Los autores del trabajo no especifican que tipo de queso fue utilizado para el estudio

4.2 MICROORGANISMOS PATÓGENOS TRANSMISIBLES POR QUESO

Para este estudio se contemplan 2 patógenos: *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes*, los cuales serán descritos en esta sección y contemplados en

el estudio por la frecuencia en su aislamiento y asociación a brotes donde han sido implicados quesos.

4.2.1 *Salmonella* spp

Bacilo Gram negativo, de la familia *Enterobacteriaceae*, generalmente móviles, aerobios o anaerobios facultativos, tienen una rica composición antigénica que se emplea como base para la identificación de sus miembros en serovares (Fernández, 2008).

Aunque en la actualidad existen alrededor de 2500 serovares, todos considerados potencialmente patógenos para el hombre, sólo a 200 se les asocia con enfermedad humana (Rodríguez, 2013). Actualmente y con base en estudios moleculares, se considera que el género está formado por dos especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*, a su vez, *Salmonella enterica* engloba 6 subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (Tindal, 2005).

El hábitat natural de *Salmonella* spp. es el tracto intestinal de humanos y animales de abasto, animales salvajes, roedores, animales de compañía, aves, reptiles e insectos, por lo regular sin presentar enfermedad manifiesta. Los animales domésticos o salvajes constituyen un inmenso reservorio a partir de la cual las salmonelas pueden dispersarse en el ambiente y en especial al agua y a los alimentos (Rodríguez, 2013).

Según el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) reportó en el 2010 que *Salmonella* spp es la causa principal de enfermedad de origen alimentario y aproximadamente son reportados en Estados Unidos 40000 casos anuales (Shrestha, 2011). La salmonelosis se manifiesta mediante varios síndromes clínicos diferentes como: enteritis, enfermedad sistémica y colonización asintomática (Rodríguez, 2013).

Su periodo de incubación es en promedio de 6 a 36 horas y una duración de la enfermedad de uno a 4 días; los síntomas principales son fiebre ligera, náuseas,

vómito, dolor abdominal y diarrea durante unos pocos días pero, en algunos casos pueden persistir durante una semana o más; mialgias y dolor de cabeza son comunes. Las infecciones gastrointestinales están relacionadas sobre todo con aquellos serovares que existen en los animales y en las personas. La tasa de mortalidad de este tipo de salmonelosis se sitúa entre 0.1 y 0.2%.

La capacidad de *Salmonella* para causar infección depende de varios factores, entre los que destacan, los intrínsecos de la bacteria como son tipo de cepa, susceptibilidad y virulencia; y del huésped como es el estado inmune (Rodríguez, 2013).

4.2.2 *Listeria monocytogenes*

Este patógeno constituye una de las principales bacterias patógenas transmitidas por el consumo de alimentos desde hace aproximadamente 30 años, *Listeria monocytogenes* es un bacilo corto Gram positivo, no esporulado, catalasa positivo y oxidasa negativo, que hidroliza la esculina, móvil debido a flagelos peritricos y anaerobio facultativo. Existen 13 serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7) capaces de causar enfermedad (Fenández, 2008; Martínez, 2013).

La bacteria posee propiedades que favorecen o le facilitan su supervivencia en alimentos y por ende su transmisión mediante ellos. Esto es, que posee relativa resistencia a ácidos orgánicos y a concentraciones elevadas de sal, crece a temperaturas bajas, lo que significa que puede multiplicarse o sobrevivir en alimentos refrigerados, características que los quesos poseen y por lo cual hacen de este alimento un sustrato al que diversas bacterias no pudieran sobrevivir pero *Listeria monocytogenes* pudiera responder y sobrevivir (Martínez, 2013; Schrama, 2013).

La listeriosis transmitida por alimentos es una enfermedad relativamente poco común, pero grave, con tasas de letalidad alta (20-30% de los casos), comparadas con la de otros microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. Evidencias epidemiológicas sugieren que los alimentos contaminados

pueden ser la principal fuente del microorganismo. El periodo de incubación de la bacteria puede ser entre una y varias semanas después del consumo del alimento (FAO/OMS, 2004; Martínez, 2013).

La sola exposición a la bacteria no sigue necesariamente un proceso infeccioso y aunque los adultos sanos y los niños pueden sufrir de listeriosis la gran mayoría de pacientes, tiene una condición predisponente. En adultos la listeriosis pueden agruparse en dos categorías: invasiva y no invasiva; la invasiva puede estar asociada o no al embarazo y se refiere a los casos en que una infección inicial del tejido intestinal por *L. monocytogenes* deriva de la invasión de partes del organismo que habitualmente son estériles, como el útero grávido durante el embarazo, el sistema nervioso central o la sangre, o combinaciones de estos. Se caracteriza por la aparición de síntomas severos, incluyendo meningitis, bacteriemia primaria, septicemia, endocarditis, infección del sistema nervioso central, conjuntivitis y enfermedad de tipo gripa. El periodo de incubación antes del inicio de los síntomas es de aproximadamente 30 días y la tasa de letalidad es alta, de 20 a 30%. Los casos de listeriosis no invasiva también conocida como gastroenteritis febril por listeria, se han observado en algunos brotes en los que la mayoría de los casos presentaron síntomas de gastroenteritis, como son fiebre, fatiga, mialgia, cefalea, náuseas, calambres, vómito y diarrea tras un periodo de incubación corto, típicamente de 18-27 horas, y usualmente están asociados al consumo de dosis altas del microorganismo (FAO/OMS, 2004; Martínez, 2013).

La letalidad de la listeriosis está determinada por: 1) factores intrínsecos de la bacteria como son el tipo de cepa, su virulencia y el tipo de infección que causan; 2) factores propios del huésped y estos son la condición predisponente o el estado inmunológico, estado fisiológico del paciente y 3) el alimento en el cual se transmitió la bacteria (Martínez, 2013).

4.3 COMPORTAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN LOS ALIMENTOS

La inocuidad microbiana de un alimento debe estar cuidadosamente controlada para asegurar la seguridad de éste, de no ser así y llegase a persistir un microorganismo patógeno, se ha visto que la mayoría de los microorganismos patógenos suelen manifestar potencial para desarrollar en los alimentos, lo que depende de una variedad de factores ecológicos.

El efecto de los factores ecológicos (Tabla 2) sobre el destino de un microorganismo en particular, puede ser positivo (sobrevivencia/desarrollo) o negativo (inactivación) dependiendo de las condiciones en las que se encuentre el alimento al momento en el que el microorganismo llegue a él, y también de las condiciones en las que se mantenga en su manejo posterior a dicha contaminación (Tejeda, 2004).

Tabla 2. Factores ecológicos que afectan la sobrevivencia y desarrollo microbiano en los alimentos.

Intrínsecos.

Del alimento:

Integridad física

Nutrientes disponibles

Potencial de hidrógeno (pH)

Potencial óxido – reducción (Eh)

Actividad de agua (Aw)

Sustancias antimicrobianas

De los microorganismos

Número y tipo

Adaptación al sustrato

Estado fisiológico

Asociaciones microbianas

Extrínsecos

Temperatura

Composición de la atmósfera

Humedad relativa

Interrelaciones

Fuente: Fernández, 2008

4.3.1 Factores ecológicos que influyen en el desarrollo bacteriano en el queso.

El conocimiento de cada uno de los factores resulta esencial para evaluar niveles de riesgo en los alimentos (Tejeda, 2004; Fernández, 2008).

Los tres factores que en los alimentos tienen un efecto más evidente sobre la cinética de desarrollo de los microorganismos son: el pH, la temperatura y la actividad de agua (A_w), sin embargo, no significa que sean los únicos, por ejemplo, en los quesos a estudiar un factor que es de interés también es la cantidad de sal del alimento.

Además de su influencia directa en el sabor del queso, el contenido de sal puede ser crítico desde un aspecto microbiológico ya que la adición de sal puede ser esencial para restringir el crecimiento de patógenos, también ayuda a controlar la supervivencia y el metabolismo de las bacterias ácido lácticas (BAL) (Mc Mahon, 2014), pero existe un factor importante en la cantidad de sal adicionada a los quesos, y es que la tendencia actual es que los quesos contengan una menor concentración de sales, lo cual aumenta la A_w , y puede aumentar el riesgo microbiano (Lee, 2014).

El requerimiento de agua para sostener las funciones vitales, no se satisface sólo con el aporte de este elemento. El agua puede estar en los alimentos en forma libre, ligada y como agua de hidratación. Los microorganismos pueden aprovecharla cuando está en forma libre. La Aw, es en realidad, una medida del grado con el cual el agua de un alimento puede ser aprovechada por los microorganismos (Tejeda, 2004; Fernández, 2008).

En los quesos, el pH afecta las propiedades estructurales de éste, pero también juega un papel importante en la sobrevivencia y desarrollo de los microorganismos. Este efecto se advierte en los procesos donde se requiere de la actividad enzimática (nutrición, respiración y multiplicación), la cual varía para cada tipo de microorganismo (Fernández, 2008). Es importante destacar que el pH de los quesos mexicanos puede oscilar entre 5.6 y 6.5 (Ramírez, 2012; Rosado-Zarrabal, 2013), debido a la acidificación de la cuajada durante el proceso de elaboración (Rosado-Zarrabal, 2013).

Finalmente, todas las reacciones biológicas fundamentales son dependientes de la temperatura y por ello influyen en el desarrollo y viabilidad de los microorganismos. El efecto de la temperatura se manifiesta en la duración de la fase lag, la tasa de desarrollo o tiempo de generación, el número o concentración final alcanzada y el tiempo para ello requerido. La respuesta de la actividad microbiana a los cambios de temperatura son más inmediatos e intensos que los observados frente a otros factores. El comportamiento a diferentes temperaturas está determinado por las características intrínsecas de cada microorganismo (Fernández, 2008).

Al ser productos frescos y perecederos lo recomendable es que sean almacenados en temperaturas de refrigeración (Orozco-Ramírez, 1999). La importancia de esta temperatura está en función del tiempo de almacenamiento o vida de anaquel del producto (Bishop, 2006), es por ello que la temperatura de refrigeración es aceptada como un método para restringir el desarrollo microbiano (excepto psicrótrofos), pero no para la destrucción de los mismos (Orozco-Ramírez, 1999; Bishop, 2006).

5. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el comportamiento de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en función de la temperatura de almacenamiento y las características asociadas a la composición del queso ranchero.

4.2 Objetivos específicos

1. Conocer las características físicas y químicas del queso ranchero.
2. Determinar el perfil microbiológico y la presencia de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en queso ranchero comercial.
3. Evaluar el comportamiento de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* bajo el efecto del pH, concentración de sal y temperatura de almacenamiento en el queso ranchero
4. Evaluar el comportamiento de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en queso ranchero durante condiciones dinámicas de temperaturas.

6. MATERIALES

6.1 Equipos

- × Agitador mecánico Vortex Fisher Scientific
- × Autoclave eléctrica de mesa (All american)
- × AquaLab CX-2
- × Balanza analítica, Answorth 100
- × Balanza granataria, Ohaus
- × Baño María con circulación mecánica, precisión 251
- × Baño María con termostato, RIOSSA
- × Bolsas de plástico estériles
- × Bolsas de polietileno presentación en rollo, sin marca comercial
- × Campana de flujo laminar, Alder
- × Centrífuga de mesa, Sol-Bat 1300
- × Cuenta colonias Quebec
- × Hogenizador peristáltico Stomacher, Stewar 400
- × Incubadora a 30 y 35°C, Felisa
- × Incubadora refrigeradora a 22°C, Presicion Scientific 815
- × Lámpara de luz UV de 360 nm, Blak-Ray
- × Materiales de uso común en el laboratorio de microbiología
- × Micropipetas de 5-1000 µL, Labsystems
- × Ollas de presión Presto, Steele
- × Potenciómetro Orion 410A
- × Refrigerador IEM
- × Termómetro de máximas y mínimas Brannan
- × Termociclador (Techne TC-512)

6.2 Medios de cultivo

- × Agar base sangre (ABS)
- × Agar bilis rojo violeta (ARVB)
- × Agar hierro lisina (LIA)
- × Agar Man Rogosa Sharpe (AMRS)
- × Agar Oxfor modificado (MOX)
- × Agar papa dextrosa (PDA)
- × Agar sulfito de bismuto (ASB)
- × Agar soya tripticaseina (AST)
- × Agar triple azúcar y hierro (TSI)
- × Agua peptonada (AP)
- × Agar xilosa lisina desoxicolato (AXLD)
- × Caldo de enriquecimiento para *Listeria* (LEB)
- × Caldo lactosado (CL)
- × Caldo Rappaport-Vassiliadis (CRP)
- × Caldo rojo de fenol (CRF)
- × Caldo tetrionato (CTT)
- × Caldo urea (CU)
- × Diluyente de peptona (DP)
- × Medio ácido sulfhídrico-indol-movilidad (SIM)
- × Solución salina isotónica (SSI)

6.3 Reactivos

- × Ácido láctico
- × Antisuero monovalente para *L. monocytogenes* serotipo O:1 y O:4
- × Antisuero polivalente para *Salmonella*
- × Manitol, MERCK
- × NaOH 0,1 N
- × Peróxido de hidrogeno, RG
- × Ramnosa, Sigma
- × Rifampicina
- × Solución buffer pH 4 y pH 7

- × Solución indicadora de fenolftaleína
- × Xilosa, Sigma

6.4 Material biológico

6.4.1 Cuajada de queso ranchero

En una industria quesera local, se obtuvo cuajada de queso ranchero en la etapa previa al salado y moldeado.

6.4.2 Cepas bacterianas

- × Cepas de referencia: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 23595, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Thompson ATCC 8391, *Salmonella* Montevideo ATCC 8387, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Listeria monocytogenes* LCDC y *Listeria monocytogenes* V7. Cepas pertenecientes al cepario del laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos.

- × Cepas de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* aisladas en este proyecto.

7. METODOLOGÍA

7.1 Perfil microbiológico del queso ranchero

7.1.1 Obtención de las muestras

Se realizaron muestreos a mercados públicos y supermercados de la ciudad de Querétaro, donde se obtuvieron muestras de queso ranchero.

La selección de los lugares de muestreo de supermercado tuvo como criterio de inclusión el que fuera una cadena comercial popular, y que contara con la mayor cantidad de marcas de queso ranchero a la venta en sus vitrinas.

Las muestras de mercados públicos se obtuvieron en los mercados: Escobedo, Hidalgo, el tepetate y la cruz, que se encuentran ubicados en la delegación del centro histórico. Esta delegación abarca el 35% de la población del municipio (datos obtenidos de un trabajo previo en el laboratorio, Castelan-Farias, 2014). Dentro de estos mercados, los establecimientos seleccionados fueron los que propiamente expenden lácteos de pequeñas o medianas empresas, o netamente artesanales (sin marca).

Tabla 3. Número de muestras por mercado público

Mercado	Número de muestras
La cruz	20
El tepetate	17
Escobedo	15
Hidalgo	16

Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Inocuidad Microbiana en una hielera y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su análisis, transcurriendo un lapso no mayor a 2 h.

Los análisis a realizar fueron la cuantificación de bacterias ácido lácticas (BAL), mohos y levaduras, enterobacterias, coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli* y la investigación de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*; también se llevó a cabo la determinación de pH, acidez, % de NaCl y Aw.

7.1.2 Preparación de las muestras para su análisis microbiológico

Se pesaron asépticamente 10 g de muestra, se homogenizaron con ayuda del Stomacher® con 90 mL de diluyente de peptona, y se realizaron las diluciones decimales adecuadas, considerando la carga microbiana teórica o esperada para cada grupo indicador (BAL, coliformes, Enterobacteriaceae, hongos y levaduras).

7.1.3 Cuantificación de bacterias ácido lácticas (BAL)

El recuento de BAL se efectuó mediante la técnica de extensión en superficie en agar Man, Rogosa, Sharpe (MRS) y se incubaron a 30°C por 48 horas

Basado en la metodología de Man *et al.* (1960); Ramos-Izquierdo *et al* (2009)

7.1.4 Cuantificación de coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y *E. coli* por el método de número más probable (NMP)

A partir de las diluciones decimales preparadas se transfirió 1 ml a caldo lactosado (CL), se incubó a 35°C por 48 horas. Los tubos que presentaron turbidez y gas se les consideraron presuntivamente positivos y se les realizó la prueba confirmatoria para CT.

Para ello de los tubos sospechosos en la prueba anterior se transfirieron 100 µL a caldo lactosa verde brillante bilis (CLBVB) y se incubaron a 35°C por 48 horas.

Los tubos que presentaron turbidez y gas se consideraron positivos y se estimó la concentración obtenida de CT.

Para confirmar la presencia de CF de los tubos presuntivamente positivos en CL se transfirieron 100 µL a CLBVB y se incubaron a 44.5°C por 48 horas. Los tubos que presentaron turbidez y gas se consideraron positivos y se hizo el cálculo pertinente para conocer la concentración de CF.

A partir de los tubos de CL presuntivamente positivos a CT se transfirieron 100 µL a caldo lauril sulfato MUG (CLS) y a agua peptonada y se incubaron a 44.5°C por 48 horas. Se consideraron positivos los tubos con presencia de gas, indol y fluorescencia a la luz UV.

Basado en la metodología del Bacteriological Analytical Manual (Feng, 2013)

7.1.5 Cuantificación de mohos y levaduras

La cuantificación de mohos y levaduras se efectuó mediante la técnica de vaciado en placa en agar papa dextrosa (PDA) acidificado con ácido tartárico y se incubaron a 25°C por 5 días.

Se estimaron de manera independiente el contenido de mohos y levaduras.

Basado en la metodología del Bacteriological Analytical Manual (Tournas, 2001)

7.1.6 Detección de *Salmonella* spp.

Se pesaron asépticamente 25 g de la muestra y se preenriquecieron con 225 mL de caldo lactosado, se homogenizó la muestra en el Stomacher®, y se incubó a 35°C por 24 horas. Posteriormente se enriqueció transfiriendo 1 mL de CL a 9 mL de caldo tetrionato y 1 mL a 9 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis y ambos tubos se incubaron a 42.5°C de 18 a 24 horas. El aislamiento se realizó en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) y agar Sulfito de Bismuto (SB). Todas las placas se incubaron a 35°C por 24 h. Las colonias presuntivas se confirmaron

bioquímicamente en agar triple azúcar hierro (TSI), agar hierro lisina (LIA), y caldo urea, por serología con antisueros polivalentes y por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la PCR se siguió la siguiente metodología:

La colonia presuntiva a confirmar se transfirió a caldo soya tripticasa y se incubó durante 24h a 35 °C, posteriormente se tomó 1 ml del cultivo y se centrifugó (4500g por 10 min) y se decantó el sobrenadante; se agregó 1 ml de solución salina isotónica estéril, este procedimiento de lavado se repitió dos veces y finalmente el paquete celular se resuspendió en solución salina. Se homogenizó en vortex y se extrajo el ADN mediante el calentamiento en un termoblock (99 °C por 60 min).

La mezcla de reactivos del PCR consistió en 12.5 µL de master mix Go-Taq colorless - Promega, 1 µL de cada iniciador (Tabla 4), 2 µL de ADN y 8.5 µL de agua grado molecular para dar un volumen final de reacción de 25 µL. El PCR se realizó en un termociclador (Techne), con una etapa inicial de desnaturalización a 95 ° C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de amplificación (93°C/10 s, 42°C/ 42 s y 72°C/45 s), y extensión final de 72°C por 10 min.

El producto de esta PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 100V/90min.

Tabla 4 Iniciadores para la identificación del gen *InvA* en *Salmonella*

Iniciador	Secuencia	Tamaño esperado (pb)	Referencia
InvA F	CTGTTGAACAACCCATTTGT	437	Liu <i>et al.</i> , 2002
InvA R	CGGATCTCATTAATCAACAAT		

Basado en la metodología del Bacteriological Analytical Manual (Andrews, 2015)

7.1.7 Detección de *Listeria monocytogenes*

Se pesaron asépticamente 25 g de la muestra y se enriquecieron con 225 mL de caldo *Listeria* enrichment broth (LEB), se homogenizó la muestra en el Stomacher®, y se incubó a 30°C por 48 horas. Se inoculó por estría cruzada en agar Oxford modificado (MOX) y se incubó a las 24 y 48 horas. Las colonias presuntivas se confirmaron mediante pruebas bioquímicas: fermentación de manitol, ramnosa y xilosa, movilidad en SIM a 22°C. También se incluyó una prueba de PCR, siguiendo la siguiente metodología:

Para la extracción del DNA, se realizó como se describió en el apartado 7.1.6.

La mezcla de reactivos del PCR consistió en 12.5 µL de master mix Go-Taq colorless - Promega, 1 µL de cada iniciador (Tabla 5), 2 µL de ADN y 8.5 µL de agua grado molecular para dar un volumen final de reacción de 25 µL. El PCR se realizó en un termociclador (Techne), con una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguido por 25 ciclos de amplificación (94°C/30 s, 60°C/25 s y 72°C/25 s), y extensión final de 72°C por 5 min.

El producto de esta PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 100V/90min.

Tabla 5 Iniciadores para la identificación del gen *Hly* en *Listeria monocytogenes*

Iniciador	Secuencia	Tamaño esperado (pb)	Referencia
LM1 F	CCTAAGACGCCAATCGAA	702	Aznar <i>et al.</i> 2002
LM1 R	AAGCGCTTGCAACTGCTC		

Basado en la metodología del Bacteriological Analytical Manual (Hitchins, 2016)

7.2 Características fisicoquímicas del queso ranchero

7.2.1 Determinación de pH

Una porción de 10 g de muestra se homogenizó en 10 mL de agua destilada recién hervida y enfriada hasta temperatura ambiente. La medición se realizó en un potenciómetro (Jenway, 3510 PH meter). Las mediciones se hicieron por duplicado para cada muestra y se obtuvo el promedio.

Basado en la metodología de NMX-F-099-1970

7.2.2 Determinación de actividad de agua (A_w)

Para la determinación de la A_w se utilizó el equipo Aqualab Lite, calibrado con soluciones estándares, y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las lecturas se hicieron por duplicado para cada muestra y se obtuvo el promedio.

7.2.3 Cuantificación de cloruro de sodio (% de NaCl)

En un matraz Erlenmeyer se pesaron de 0.15 a 0.17 g de queso ranchero, se añadieron 75 mL de agua hervida y enfriada (50 a 55 °C). Se añadió 1 mL de solución indicadora de cromato de potasio al 5% mezclando agitando. Se tituló con solución de nitrato de plata ($AgNO_3$ 0.1 N) hasta el viraje de color pardo naranja permanente y detectable. Se realizó un blanco. El contenido de NaCl se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%NaCl = \frac{(0.0585)(NAgNO_3)(VAgNO_3_{utilizado} - VAgNO_3_{blanco})}{(\text{peso muestra en g})} \times 100$$

Las determinaciones se hicieron por duplicado para cada muestra y se obtuvo el promedio.

Basado en la metodología de la NMX-F-150-S-1981.

7.2.4 Determinación de acidez titulable

Para la determinación de la acidez titulable, porciones de 10 g de queso ranchero fueron diluidas y homogenizadas en 10 mL de agua destilada recién hervida y enfriada a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 5 gotas de solución alcohólica de fenolftaleína y se titularon con NaOH 0.1N. Se calculó la acidez como porcentaje de ácido láctico mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ácido láctico} = \frac{(V_{\text{NaOH}})(N_{\text{NaOH}})(9)}{(\text{peso muestra})}$$

Las determinaciones se hicieron por duplicado para cada muestra y se obtuvo el promedio.

Basado en la metodología de AOAC, 2014

7.3 Comportamiento de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en queso ranchero: durante condiciones dinámicas de temperaturas y a diferentes niveles de pH y % de NaCl.

7.3.1 Preparación y estandarización del inóculo

Previo a la preparación y estandarización del inóculo las cepas a probar (aisladas del queso ranchero), se les indujo la resistencia a la rifampicina (200ppm).

Se prepararon cultivos frescos de cada una de las cepas a probar, mediante tres transferencias sucesivas en caldo soya tripticaseína, incubadas a 35°C por 24 h

y a las 18 - 20 h de incubación de la última transferencia se cosecharon las células por centrifugación (4000 rpm durante 15 min a 22°C). Los paquetes celulares fueron lavados tres veces con solución salina isotónica y re suspendidos en la misma.

Para obtener el nivel de inóculo deseado se prepararon diluciones decimales en diluyente de peptona (DP). El recuento de la suspensión celular utilizada como inóculo se realizó mediante la técnica de extensión en superficie en agar soya tripticaseína (AST) adicionado con rifampicina (200ppm), incubando a 35°C durante 24 h.

7.3.2 Modificación de los niveles de pH y % sal.

A la cuajada obtenida en la industria quesera, se le añadió la cantidad correspondiente de NaCl, para poder obtener las concentraciones de 1.5, 2.5 y 3.5% de sal, Una vez salado el queso, se colocó en porciones de 10 g en bolsas estériles y asépticamente se le añadió 100 µL de ácido láctico al 30% ó NaOH al 20%, para obtener los niveles de pH (5, 6 y 7). La cantidad de ácido láctico o NaOH añadida fue determinada previamente en una porción de queso que no fue incluida en el estudio.

Se realizó la modificación de estos factores para tener 9 tratamientos:

1. pH 5 y 1.5% de NaCl
2. pH 5 y 2.5% de NaCl
3. pH 5 y 3.5% de NaCl
4. pH 6 y 1.5% de NaCl
5. pH 6 y 2.5% de NaCl
6. pH 6 y 3.5% de NaCl
7. pH 7 y 1.5% de NaCl
8. pH 7 y 2.5% de NaCl
9. pH 7 y 3.5% de NaCl

Los niveles de pH y concentración de sal fueron verificados por las técnicas analíticas anteriormente descritas.

7.3.3 Inoculación del queso e incubación

Asépticamente se inocularon con 100 μ L de las suspensiones de *Salmonella* y *L. monocytogenes*, en las porciones de queso. Se inocularon aproximadamente 1000 células de cada patógeno de manera independiente.

Las porciones de queso ajustadas a los diferentes niveles de pH y concentraciones de sal, se almacenaron a 4 y 20°C. Por otra parte queso sin modificar se incubó a una condición dinámica que consistió en mantener los quesos en ciclos repetidos a 4°C durante 12 h., 8 h a 22°C y después 4 h a 30°C. En ambos estudios periódicamente se tomaron tres porciones por tratamiento y se cuantificaron los patógenos. Se contó con una porción no inoculada donde se cuantificó el contenido de BAL, pH y acidez como se describió anteriormente. El experimento se realizó en dos ocasiones.

7.3.4 Cuantificación de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en queso ranchero

Las porciones de queso se homogenizaron con DP y se realizaron diluciones decimales a partir del homogenizado. Se cuantificaron las poblaciones de ambos patógenos en AST adicionado con rifampicina en una concentración de 200 ppm por extensión en superficie y las placas se incubaron a 35°C por 24 h.

Obtenidos los datos se construyeron las curvas de comportamiento bacteriano.

7.3.5 Estimación de los parámetros cinéticos del comportamiento de los microorganismos en queso ranchero

Los datos obtenidos se transformaron en Log UFC y se analizaron mediante el programa de modelado DMFit versión 2.0 (<http://www.combase.cc/index.php/en/tools>). Este programa fue utilizado para obtener los parámetros de crecimiento como la velocidad de desarrollo o muerte, la duración de la fase lag y la máxima población alcanzada del microorganismo.

7.4 Análisis estadístico y diseño experimental

Para el 7.1 y 7.2 se realizó una comparación de medianas con una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis).

Para 7.3 en el apartado 7.3.2, se utilizó un diseño factorial completamente al azar, el estudio se realizó por duplicado y en cada réplica se incluyeron tres muestras de cada uno de los tratamientos. De los parámetros cinéticos obtenidos anteriormente, se efectuó un análisis de varianza para las velocidades de desarrollo/inactivación resultantes de las diferentes combinaciones de pH y concentración de sal en el queso.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Perfil microbiológico del queso ranchero

La población mexicana consume una gran variedad de quesos, sobre todo quesos frescos (Villegas, 2011). Dentro de ellos se encuentra el queso ranchero o también conocido como queso fresco elaborado con leche de vaca que puede o no estar pasteurizada, de acuerdo al nivel de producción bajo el cual se elaboran (industrial o artesanal).

Este tipo de quesos es comercializado dentro de los primeros dos días de su producción y puede ser expandido en diversos establecimientos (Saltijeral, 1999).

En este trabajo se obtuvieron 150 muestras de queso ranchero de las cuales 68 provenían de mercados públicos y 82 de supermercado, en muestreos semanales en un periodo de julio a diciembre de 2015.

Cabe mencionar que al momento del muestreo en el punto de venta se realizó la medición de la temperatura de cada muestra con un termómetro láser (Sper Scientific 800103). La temperatura las muestras del queso ranchero recolectada se encontraron entre 2 y 22°C (Figura 1) con una mediana de 9°C.

En los quesos obtenidos de supermercado se observó una menor variación en las temperaturas al momento de la compra, que la registrada para los quesos obtenidos de mercados públicos. Esta diferencia fue corroborada por el análisis estadístico que indica que existe una diferencia significativa entre ambos grupos ($P < 0.0001$).

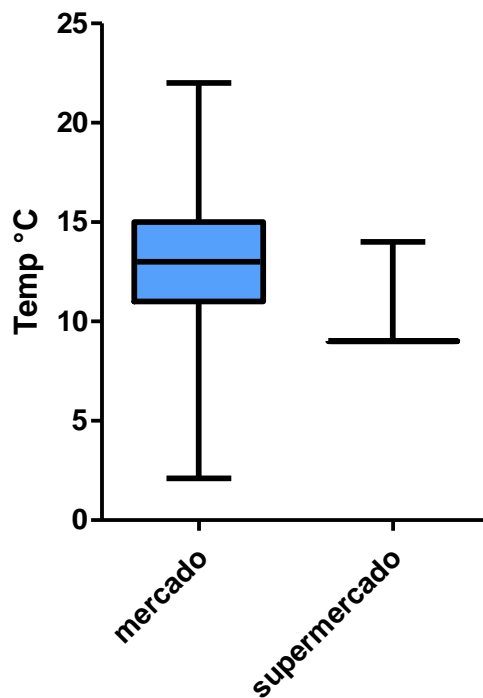


Figura 1. Perfil de temperatura de las muestras de queso ranchero al momento de su compra en mercados y supermercados.

La temperatura de almacenamiento resulta de gran importancia, ya que para productos como este que es altamente perecedero se debe preservar a una temperatura de refrigeración (idealmente de 4 a 8°C, con un máximo de 10°C) (Alcázar-Montañez *et al.*, 2006; Baldera-Zubeldia, 2016).

Esta condición permite, minimizar el desarrollo de microorganismos con capacidad de deteriorar el alimento y evitar el desarrollo de la mayoría de los microorganismos patógenos (Leong, 2014).

El no respetar esta cadena de frío durante la distribución y comercialización del alimento, es uno de los principales factores de riesgo que pueden propiciar brotes de enfermedad asociados a este alimento (Baldera-Zubeldia, 2016). Tal es el caso de más de la mitad de las muestras provenientes de mercados públicos, que no están a una temperatura de almacenamiento adecuada (Figura 1). Esta circunstancia ya se ha reportado en otros estudios (Baldera-Zubeldia, 2016).

Cabe mencionar que el abuso de temperatura, acorta la vida de anaquel del alimento, y en el caso de la presencia de algún patógeno, se puede favorecer su desarrollo y esto representar un riesgo mayor para el consumidor (2073/2005/EC, 2005; Baldera-Zubeldia, 2016).

Al querer realizar un contraste entre el origen de la muestra, se realizó un comparativo de contenido de grupos microbianos de los quesos obtenidos en supermercado y mercado público.

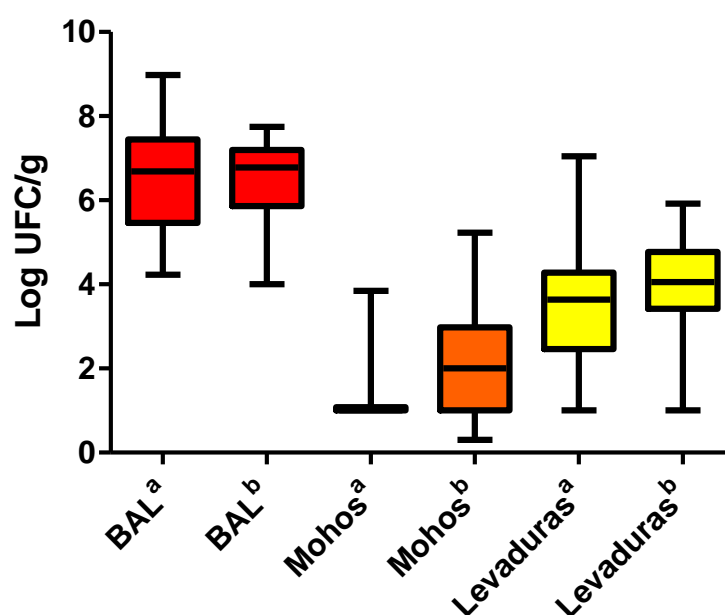


Figura 2. Contraste del contenido de BAL, mohos y levaduras de queso ranchero provenientes de supermercado (a) y mercados públicos (b).

El contenido de BAL, osciló entre 4.0 y 9.08 Log UFC/g, no observando una diferencia significativa entre las muestras colectadas en el mercado público y supermercado (Figura 2, Tabla 6) resultados similares a lo obtenido por Tassinari, *et al.* (2010) y Gonzalez-Montiel *et al.* (2015). Las concentraciones de este grupo es atribuido a la naturaleza del alimento.

Las BAL son parte de la microbiota autóctona de la leche y los productos lácteos, sin dejar de mencionar que pueden encontrarse en conteos elevados (aproximadamente 9.05 Log UFC/mL) (Farkye, 2002; Gaya *et al.*, 2005) aunque después de la pasteurización se ha observado que disminuyen a un rango entre 7.9 y 8.2 Log UFC/mL, lo que significa que se ha preservado la microbiota natural,

La presencia de estas bacterias en quesos frescos, también se asocia a la calidad del proceso de elaboración, así como a la forma de conservación, a la forma en cómo este queso es transportado y conservado en el punto de venta (Gonzalez-Montiel *et al.* 2015).

La presencia de hongos en los alimento suele asociarse con una exposición a fuentes de contaminación objetables o también a faltos de frescura (Fernandez-Escartin, 2008), en este caso los quesos provenientes de supermercado o elaborados de manera industrializada se encontraron en un rango de 1.0 a 3.8 Log UFC/g, y puede deberse a que los mohos pueden estar presentes en el ambiente de producción o estar bajo malas condiciones de elaboración (González-Montiel, 2015), mientras que en los quesos de mercado hubo mayor heterogeneidad en el contenido de hongos (0.3 a 5.2 Log UFC/g), Los niveles superiores de mohos encontrados en el alimentos pueden ser el resultado de la exposición a fuentes de contaminación o almacenamiento inadecuado. El análisis estadístico de las muestras colectadas en ambos establecimientos reveló que sí existe diferencia significativa entre los tipos de establecimientos (Figura 2, Tabla 5).

En cuanto a las levaduras la concentración encontrada fue mayor que la de los hongos, indicativo de que pueden proliferar de mayor manera. En los quesos provenientes de supermercado se encontraron de 1 a 7.1 Log UFC/g, y en los quesos provenientes de mercado público de 1 a 5.92 Log UFC/g (Figura 2), encontrándose una diferencia estadística entre ambos grupos (Tabla 5).

Estos microorganismos se encuentran en la leche contaminándola y a medida que son producidos los quesos, las características físicas y químicas del alimento cambian, hablando principalmente del pH, este puede llegar a niveles que

pueden favorecer su desarrollo (El Galiou, *et al.*, 2015), y causar alteraciones en los quesos (González- Montiel, 2015).

Tabla 6, Valores p de las diferencias en las medianas del contenido de BAL, mohos y levaduras en queso ranchero obtenido en mercado y supermercado (Kruskal-Wallis).

<i>Grupo microbiano</i>	<i>Valor p</i>
BAL	0.7437
Hongos	<0.0001
Levaduras	0.0167

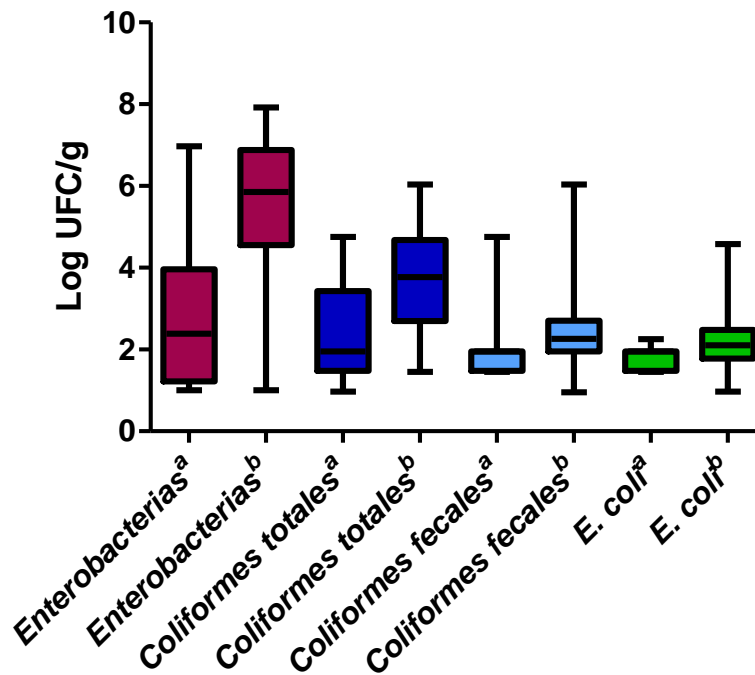


Figura 3. Contraste del contenido de Enterobacterias, coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli* de queso ranchero provenientes de supermercado (a) y mercados públicos (b).

En cuanto a este segundo conjunto de microorganismos (Enterobacterias, coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli*) también existió una diferencia significativa haciendo notar que los quesos provenientes de supermercado y los quesos provenientes de mercado público son diferentes en cuanto a su concentración de microorganismos (Tabla 6).

El contenido de Enterobacterias en quesos de supermercado se encontró en un rango de 1 a 7.0 Log UFC/g y en los quesos provenientes de mercado de 1 a 7.9 Log UFC/g. Estos resultados nos evidencian que pudiera haber exposición a superficies, utensilios y operarios durante la elaboración de los quesos, ya que de haber sido elaborado con leche pasteurizada se esperarían cifras menores o bajas. La familia de las Enterobacteriaceae tiene un significado similar a los coliformes, sin embargo por las características bioquímicas que agrupan a los

coliformes sepuede decir que esta familia es mucho más extensa (Fernández-Escartin, 2008),

La presencia de coliformes totales en quesos de supermercado se encontró en un rango de 1.0 a 4.8 Log NMP/g y para quesos de mercado de 1.45 a 6.04 Log NMP/g, coincidiendo con lo que reporta González-Montiel *et al.* (2015), pero por debajo de lo que reporta Tassinari, *et al.* (2010). Los altos contenidos de éstos grupos microbianos pueden asociarse a prácticas inadecuadas durante la comercialización o durante la elaboración del queso; por ejemplo, a la exposición con el medio ambiente y en el caso de este producto también pudiera sugerir la mala pasteurización de la leche, e inclusive el desarrollo de los microorganismos en una mal almacenamiento (Fernández-Escartín, 2008; Tassinari, *et al.*, 2010; González- Montiel *et al.*, 2015).

En cuanto a los coliformes fecales se encontraron concentraciones de 1.45 a 4.75 Log NMP/g para quesos provenientes de supermercado y para aquellos provenientes de mercado de 1.45 a 6.04 Log NMP/g. Una concentración similar reporta Soto-Beltran, *et al.* (2014). Vázquez-Fontes (2010) reporta hasta 5 log UFC/g en queso botanero, que es similar al queso ranchero, y Romero-Castillo *et al.* (2009) que reporta aun cifras más elevadas.

Elevadas concentraciones de coliformes fecales pueden asociarse a la presencia de enteropatógenos (Vázquez-Fontes, 2010; González- Montiel, 2015), esta asociación no se logró establecer en el presente trabajo.

E. coli se encontró en los quesos provenientes de supermercado en concentraciones de 1.45 a 2.25 Log NMP/g y en los quesos de mercado de 0.97 a 4.58 Log NMP/g. Estos resultados comparados con los reportados por Tassinari, *et al.* (2010), Soto-Beltran *et al.* (2014) y González- Montiel *et al.* (2015), se encuentran en niveles inferiores, sugiriendo que los quesos de este estudio mostraron mejor calidad sanitaria que los contrastados en los estudios antes citados realizados en nuestro país. Es importante remarcar que este microorganismo está más asociado a contaminación fecal y se puede establecer la posible relación o posible presencia de otros enteropatógenos (González-Montiel *et al.*, 2015).

En un estudio como este, donde se hacen comparaciones de alimentos expendidos en comercio informal o comercio establecido, es difícil establecer el origen de las poblaciones encontradas, ya que existen diversos factores que podrían estar influyendo, como la región productora (los procedimientos artesanales de cada población, nivel socioeconómico, etc.), tipo de venta (comercio formal o informal y prácticas que ahí se desempeñan), estación del año, etc, esto hace que resultados en este estudio puedan ser discrepantes a los obtenidos en estudios realizados en otras regiones del país o del mundo.

Se ha tratado de capacitar a productores e industrias para la mejora de las buenas prácticas de manufactura y garantizar la inocuidad del producto, ya que al menor fallo puede contaminarse y convertirse en un riesgo.

Tabla 7. Valores p de las diferencias en las medianas del contenido de Enterobacterias, coliformes totales, fecales y E. coli en queso ranchero obtenido en mercado y supermercado (Kruskal-Wallis).

<i>Grupo microbiano</i>	<i>Valor p</i>
Enterobacterias	<0.0001
Coliformes totales	<0.0001
Coliformes fecales	<0.0001
<i>E. coli</i>	0.0002

Es importante resguardar la inocuidad de alimentos listos para el consumo como el queso. Un paso muy importante es la pasteurización y el manejo higiénico de la leche, y siguiendo correctamente las buenas prácticas de manufactura.

Algunos autores convergen en la idea de que la mayor problemática es la elaboración de los quesos con leche no pasteurizada, ya que se espera que tenga un elevado número de bacterias contaminantes, pero aun la presencia de patógenos en un queso elaborado con leche pasteurizada indica que hubo contaminación post pasteurización, o en algún punto de producción (Soto-Beltran *et al.*, 2014)

La falta a las buenas prácticas de manufactura en México está regulada por la NOM-243-SSA1-2010, sin embargo, las autoridades aún no tienen una vigilancia extensiva a pequeños productores, resultando en la comercialización de productos de muy diversos niveles de calidad sanitaria que pueden causar problemas a la población (Soto-Beltran *et al.*, 2014).

Otro aspecto a remarcar es el tipo de comercialización en el comercio informal (vía pública), donde la exhibición del producto a temperatura ambiente y a temperaturas de refrigeración superiores a las recomendadas con el fin de ahorrar electricidad; así mismo en los mercados populares se expone el queso en ambientes abiertos y a temperaturas promedio de 22° C, durante varias horas (González-Montiel *et al.*, 2015). Esta forma de ofrecer los alimentos a los consumidores puede generar un riesgo al consumidor, ya que las condiciones en que se expenden dichos productos favorecen la contaminación del alimento y la multiplicación microbiana (Alcázar-Montañez *et al.*, 2006).

La calidad microbiológica de los alimentos que se venden en las calles se ha investigado en diferentes ciudades y países para demostrar el riesgo que representan. En México no existen registros en cuanto a la notificación de casos de enfermedades gastrointestinales y su relación con el consumo de alimentos que se expenden en la vía pública (Alcázar-Montañez *et al.*, 2006).

8.2 Incidencia de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en queso ranchero

Salmonella se detectó en 14 de las 150 muestras colectadas (9.3%) mientras que *L. monocytogenes* únicamente en 3 muestras (2.0%).

En el caso de *Salmonella* se observó una mayor incidencia que *L. monocytogenes*, así mismo, tuvo un porcentaje de positividad mayor en muestras provenientes de mercados públicos que de supermercados, caso contrario de lo que se observó en las muestras positivas para *L. monocytogenes*. (Figura 4)

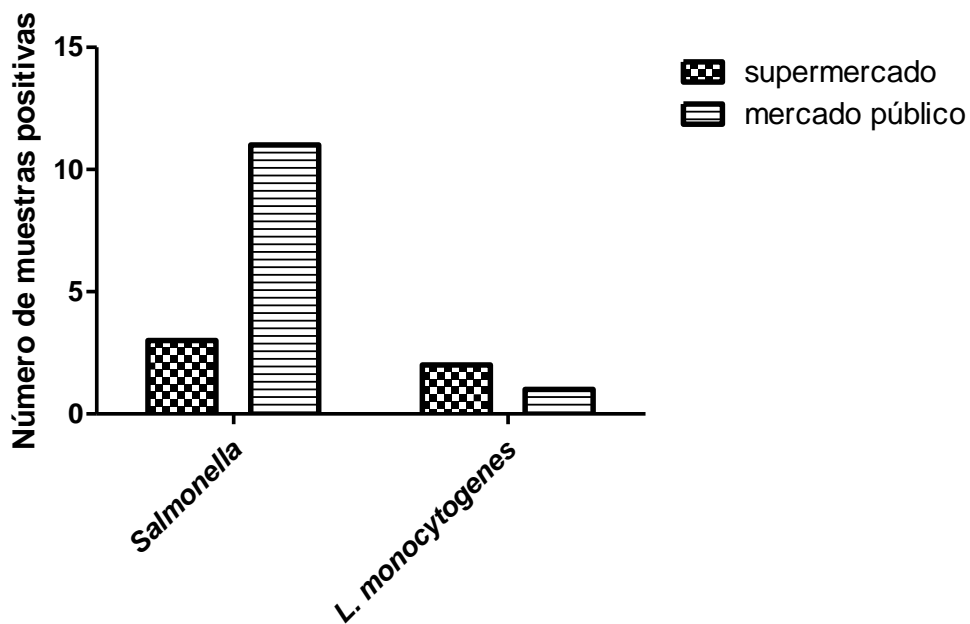


Figura 4. Incidencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en queso ranchero colectado en mercados públicos y supermercados.

Haciendo la comparación de los resultados encontrados, se tiene que Soto-Beltran *et al.* (2014) reporta presencia de *L. monocytogenes* en 7 de 75 muestras de queso fresco (9.3%) y 0% para *Salmonella*, datos contrastantes a lo observado en el presente estudio; Datos similares a los nuestros fueron

consignados por Saltijeral *et al.* (1999) con un 3.4% (5/149) muestras positivas a *L. monocytogenes*.

Moreno-Enriquez *et al.* (2007), afirma que este porcentaje (no mayor al 10%) es lo que se ha reportado comúnmente en Latinoamérica para *L. monocytogenes*, sin embargo para *Salmonella*, ha sido muy variable su incidencia, por ejemplo Torres-Vitela *et al.* (2012) reportó 17% en queso panela y 10% en queso adobera; Guzmán-Hernández, *et al.* (2011) encontró 4% en queso fresco; Avelino, *et al.* (2013) reportó el 27% en quesos frescos elaborados con leche no pasteurizada.

Los resultados del presente estudio son únicos debido a que se trata en específico de queso ranchero, mientras que en otros estudios se estudiaron diversos tipos de queso fresco (ej. Adobera, panela o incluso no especificados).

A pesar de que en algunas ocasiones las condiciones en las que se encuentran los quesos para su venta y manejo son inadecuadas (comercio informal) desde un enfoque sanitario, se debe tomar en cuenta que el queso ranchero es un producto listo para el consumo, con alta humedad, rico en nutrientes, pH cercano a la neutralidad, bajo contenido de sal, y que puede propiciar a que los patógenos desarrollen (Farkye, 2002). Todo esto hace que el consumo de este alimento represente un riesgo si no se garantiza su inocuidad.

8.3 Características físicas y químicas del queso ranchero

Los resultados para las características físicas y químicas de los quesos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 8. Características físicas y químicas de quesos rancheros

<i>Característica física o química</i>	<i>Supermercado</i>		<i>Mercado público</i>	
	Mediana	Límites	Mediana	Límites
pH	6.39	5.18-6.84	6.14	4.87-6.87
Aw	0.936	0.813-0.999	0.938	0.822-0.999
Acidez (% ác. láctico)	0.26	0.12-1.09	0.31	0.08-1.52
NaCl (%)	2.60	0.53-4.25	2.25	0.84-4.10

Los resultados obtenidos de la caracterización física y química del queso ranchero son acordes a lo que se ha descrito para el queso fresco en otros reportes, y donde se obtienen valores de Aw de 0.9, pH de 6.5 y concentración de NaCl entre 1 y 3%, o valores cercanos a éstos (Ramirez-Lopez *et al.*, 2012; Torres-Vitela *et al.*, 2012; Soto-Beltran *et al.*, 2014).

Se observó una dispersión de los datos, que puede deberse a la variabilidad de los procesos de elaboración, en las formulaciones, o calidad de la materia prima (Figura 5). Dada la dispersión de los datos no se encontró una diferencia significativa entre el origen de las muestras (Tabla 8).

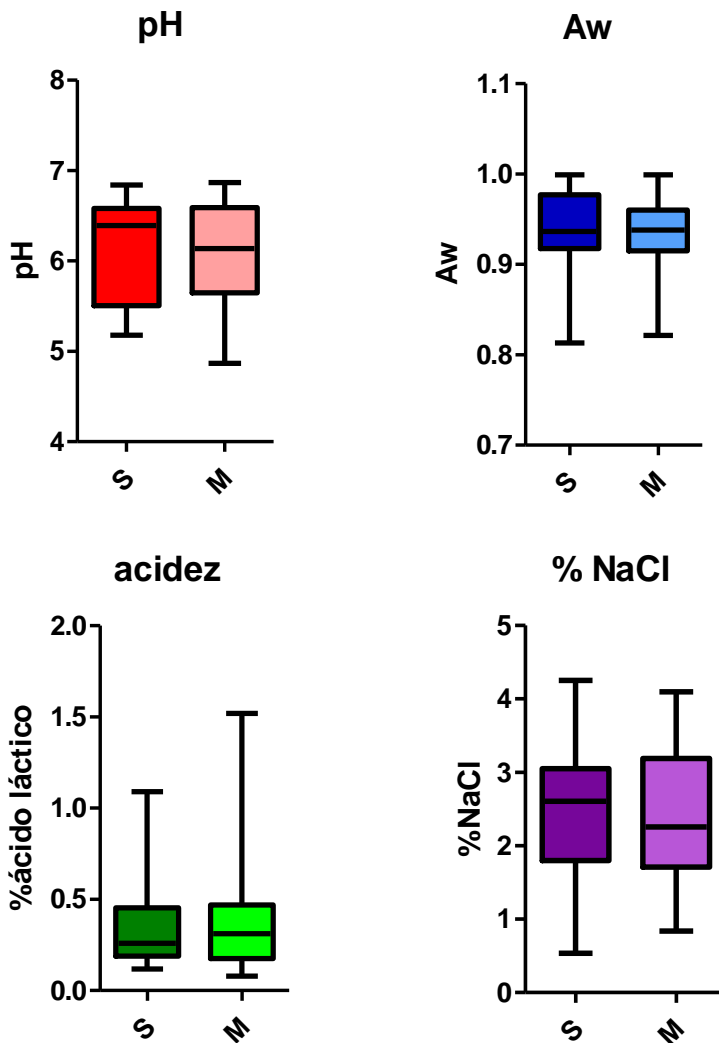


Figura 5. Características físicas y químicas del queso ranchero según su origen, S: supermercado, M: mercado público.

El pH de los quesos tuvo una dispersión tan amplia que puede deberse a la calidad bromatológica de la leche, o a la acidificación de la cuajada en su elaboración (Rosado-Zarrabal *et al.*, 2013), También pudiera deberse a la actividad microbiana y la producción de ácidos orgánicos, sobre todo el láctico.

Tabla 9 Valores p de las diferencias en las medianas del pH, acidez, %NaCl y Aw en queso ranchero obtenido en mercado y supermercado (Kruskal-Wallis).

<i>Parámetro</i>	<i>Valor p</i>
pH	0.3267
Aw	0.7412
Ácido láctico (%)	0.1910
NaCl (%)	0.1021

8.4 Comportamiento de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en queso ranchero

8.4.1 Comportamiento de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en queso ranchero durante condiciones dinámicas de temperatura

Mediante la observación a los establecimientos donde se expende el queso ranchero durante la colecta de las muestras, se detectaron algunas prácticas de almacenamiento inadecuado, como es mantener por largos periodos de tiempo el producto fuera de refrigeración, mantener el producto sin empaque o empaques no adecuados, exposición del producto a fuentes de contaminación como moscas, superficies de equipos, superficies donde se manipuló otro tipo de producto, manipulación de otros consumidores, proximidad con otros comercios, contaminación cruzada (uso de utensilios no propios para este producto, superficies, etc.). De éstos hallazgos, surge la necesidad de llevar a cabo una prueba *in vitro* para conocer el comportamiento de los patógenos en estudio, y así simular una contaminación y que ocurriría en el producto almacenado bajo las condiciones observadas en este tipo de establecimientos.

En relación al comportamiento de los patógenos bajo condiciones dinámicas de temperatura (4-7°C/12h, 22°C/8h, 30°C/4h), *Salmonella* mostró habilidad para desarrollar en estas condiciones de temperatura en queso ranchero. Se registró

un incremento promedio de 2.2 Log UFC/g, es decir aumentó su concentración de 3.79 ± 0.08 a 6 ± 1.04 Log UFC/g, (Figura 6). Se graficaron por separado las tres réplicas que se llevaron a cabo, debido a que sólo en la réplica 2 y 3 se observó un comportamiento similar, a diferencia de la réplica 1. Sin embargo el resultado siempre fue el desarrollo de *Salmonella*. Estos resultados coinciden con lo que Orozco-Ramírez (1999) reportó en queso Oaxaca a los 2 días de almacenamiento a la misma condición, manteniéndose esta concentración hasta el día 4.

En el caso de *Salmonella*, se tiene reportado que la naturaleza misma de esta bacteria la hace tolerante a ciertas concentraciones de ácidos.

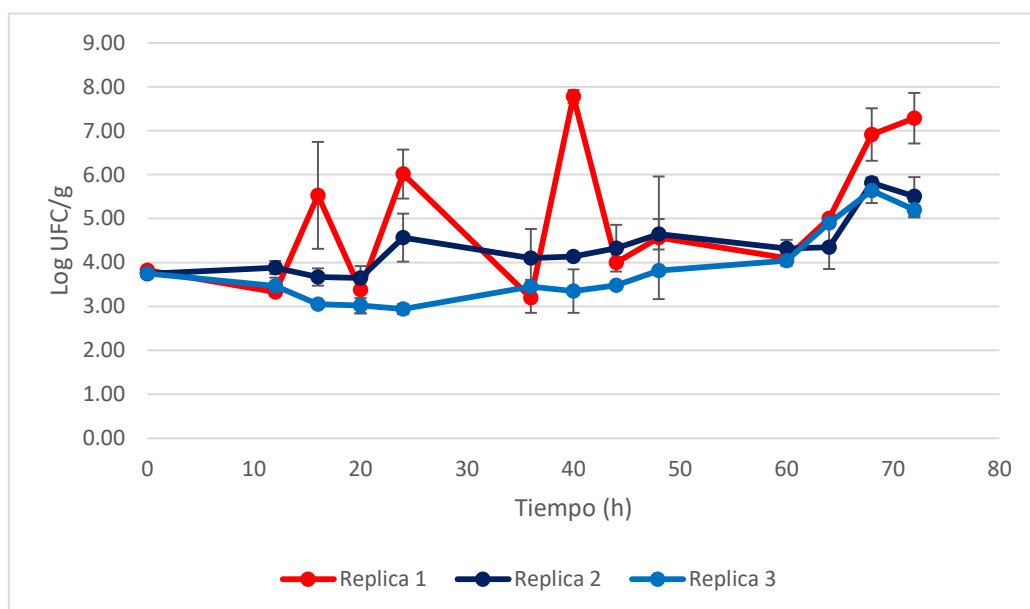


Figura 6. Comportamiento de *Salmonella* a temperaturas dinámicas (4-7°C/12h, 22°C/8h, 30°C/4h) en queso ranchero.

En contraste *L. monocytogenes* mostró tendencia a la inactivación (Figura 7) contrario a lo que Orozco-Ramírez (1999) reportó en queso Oaxaca incubado bajo las mismas condiciones, donde aumenta su concentración 2 a 3 Log UFC/g, con respecto al número inicial del inóculo. La diferencia entre los comportamientos observados entre las réplicas puede atribuirse a las condiciones del ambiente, o del alimento que fueron diferentes en cada

experimento; sin embargo, todas las dinámicas coinciden en que a 0.20% de ácido láctico y 8 Log UFC/g de BAL comienza a mostrarse una disminución del patógeno, ocurriendo aproximadamente entre las 40 y 44 horas de almacenamiento.

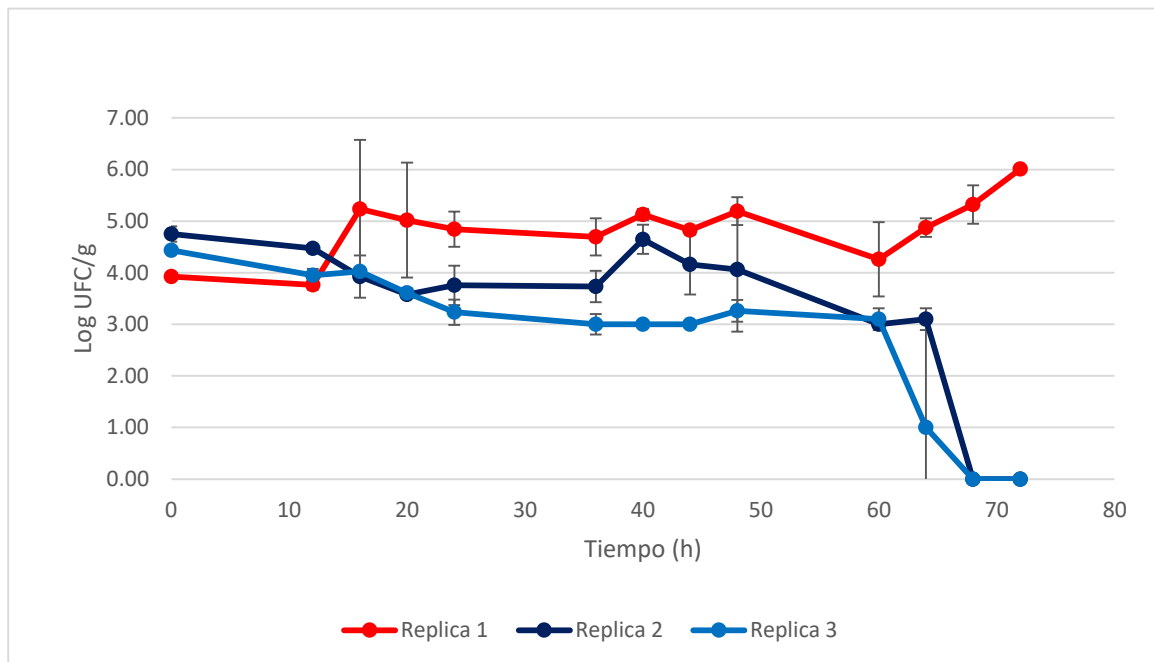


Figura 7. Comportamiento de *L. monocytogenes* a temperaturas dinámicas (4-7°C/12h, 22°C/8h, 30°C/4h) en queso ranchero.

Durante las condiciones dinámicas de temperatura, se tuvo la intención de medir la microbiota predominante del alimento (BAL), y como se comportaba a estas temperaturas. Lo que se observó fue que la concentración de BAL se mantuvo o se estabilizó en los 8 Log UFC/g, inclusive en una de las réplicas donde el número inicial fue de 4.9 Log UFC/g (Figura 8).

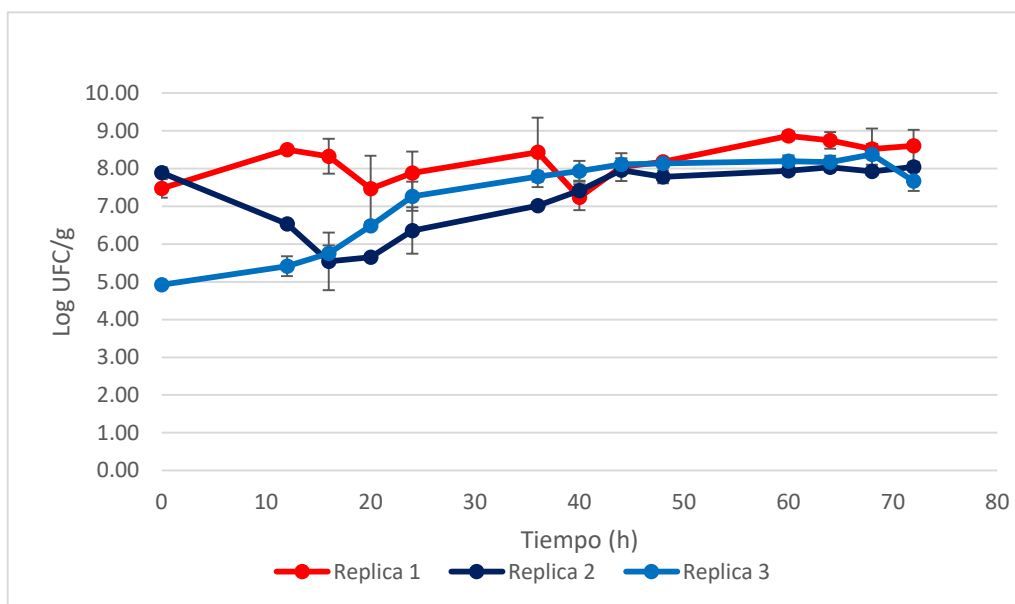


Figura 8. Comportamiento de BAL bajo condiciones dinámicas de temperatura (4-7°C/12h, 22°C/8h, 30°C/4h) en queso ranchero.

Es importante mencionar que la máxima población observada fue poco menos de 9 Log UFC/g, y se alcanzó a partir de las 60h de almacenamiento, esta población se mantuvo estable hasta el final de la cinética (72 h). La aparición de signos de deterioro en el producto se presentó entre las 64 y 72 h.

Durante la cinética de los patógenos en el alimento se dió seguimiento a la evolución del pH (Figura 9) y la acidez, (Figura 10) en el queso ranchero, el cual fue sometido a las temperaturas dinámicas. El pH de 7.02 ± 0.29 disminuyó a 5.89 ± 0.22 , y en una relación inversa la acidez aumento de 0.14 ± 0.04 a 0.40 ± 0.12 . Estos resultados hacen ver que las características del queso van a cambiar a lo largo del tiempo y se ven afectadas por las condiciones de temperatura, favoreciendo la proliferación de microorganismos, impidiendo su desarrollo, o también como muestra de su actividad metabólica.

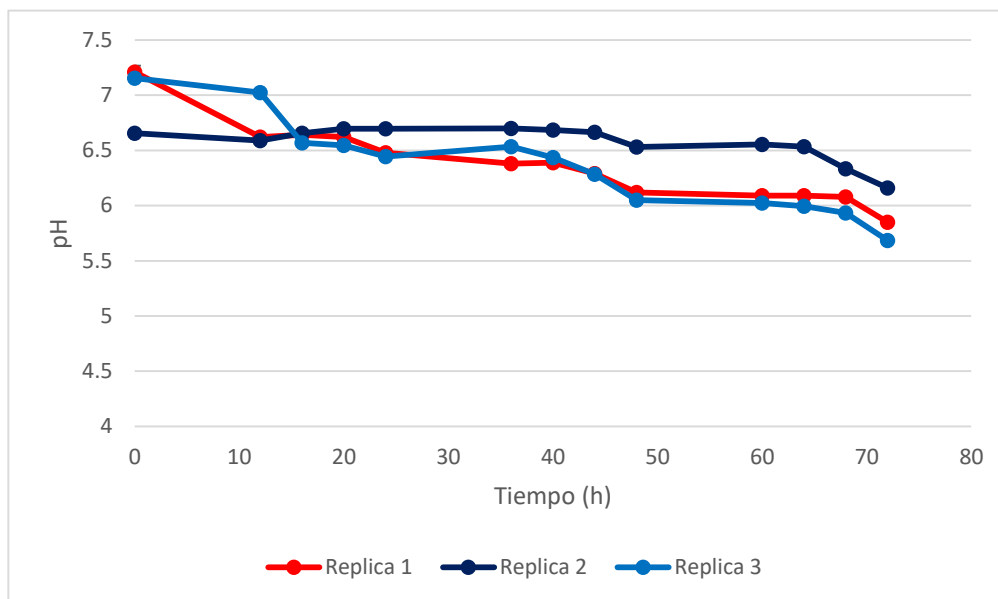


Figura 9. pH del queso ranchero almacenado en temperaturas dinámicas (4-7°C/12h, 22°C/8h, 30°C/4h)

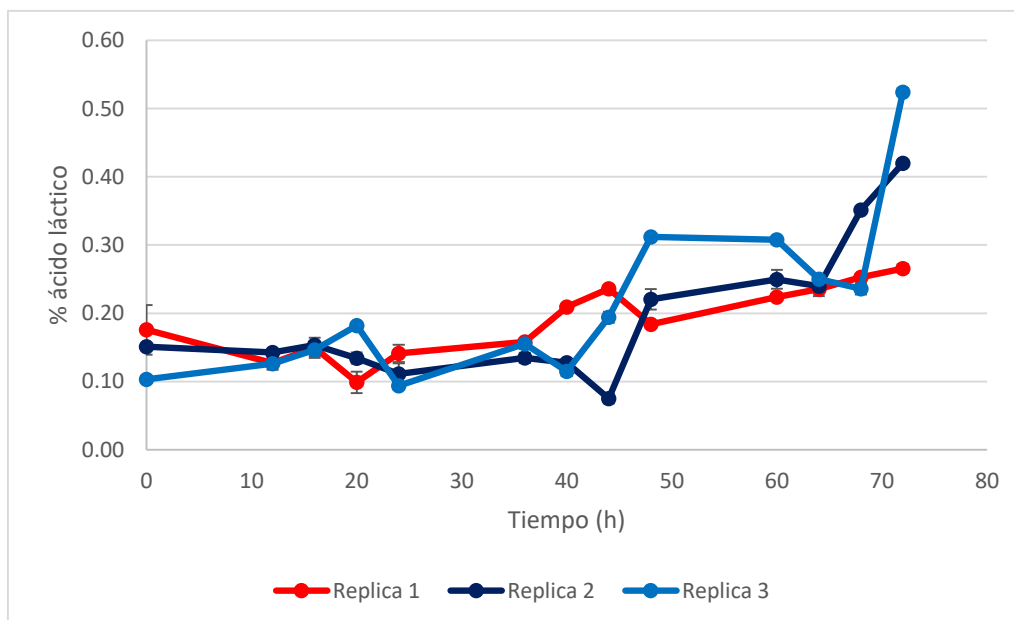


Figura 10. Porcentaje de ácido láctico del queso ranchero almacenado en condiciones dinámicas de temperatura (4-7°C/12h, 22°C/8h, 30°C/4h).

Al analizar la información de las variables de respuesta estudiadas (pH, acidez, crecimiento de BAL y cinética de *L. monocytogenes*), se puede inferir que existe cierta relación entre la actividad metabólica que presentaron las BAL, y su efecto en el comportamiento de *L. monocytogenes*, ya que cuando se observa un crecimiento o una estabilidad de las BAL, aumenta el porcentaje de ácido láctico y disminuye el pH, y cuando esto sucede, *L. monocytogenes* sufre una reducción en su población. Éstos resultados concuerdan con lo que Spahr y Url (1994), Bachmann y Spahr (1995) reportan, y es que la rápida acidificación de la masa del queso por producción de ácido láctico es el principal factor responsable de la inhibición o destrucción de microorganismos patógenos.

Así mismo Secchini *et al.* (1955) proponen que el efecto inhibitorio o bactericida se pudiera atribuir a la cantidad de microbiota inicial, como se observa en la figura 8, en donde el número inicial fue de 5 Log UFC/g y se incrementó hasta un poco más de 8 Log UFC/g, a esta concentración ya es más notable el efecto anteriormente descrito.

En la Figura 11 se puede observar más claramente el cambio que hubo en la concentración de ácido láctico, con respecto a la actividad de las BAL, y cómo influye en el comportamiento de *L. monocytogenes*.

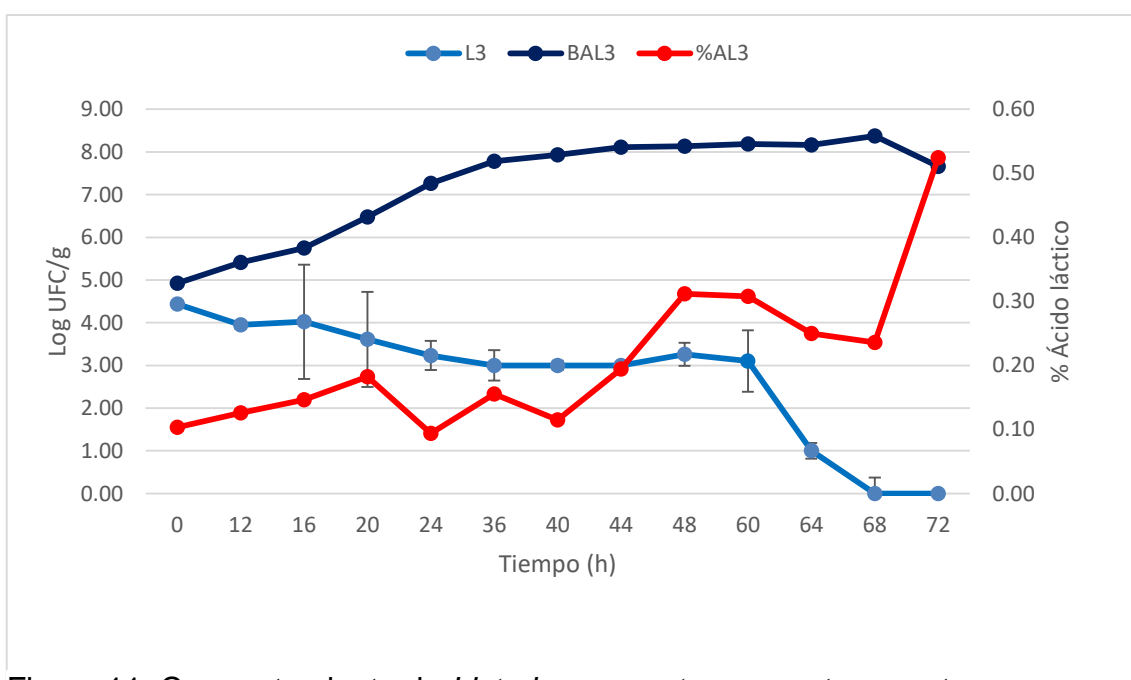


Figura 11, Comportamiento de *Listeria monocytogenes* a temperaturas dinámicas (4-7°C/12h, 22°C/8h, 30°C/4h) en queso ranchero (Replica 3).

Se observa como aproximadamente a la hora 16, *L. monocytogenes* empieza a inactivarse, cuando la concentración de BAL comienza a aumentar y también lo hace la concentración de ácido láctico.

En el caso de la réplica 1 (Figura 12), se observó que a pesar de que la población de BAL no desarrolló como en la anterior (replica 3), la concentración de ácido láctico tampoco llegó a concentraciones por arriba de 0.25%, que es donde se comienza a observar un efecto sobre *L. monocytogenes*. Asimismo, no se observa una inactivación del patógeno.

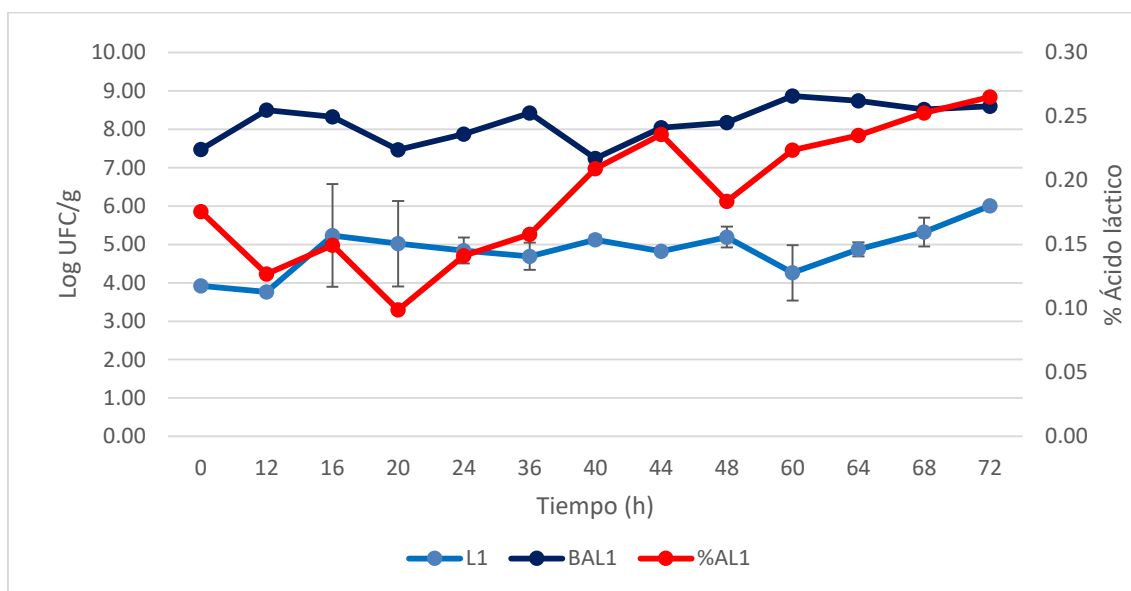


Figura 12. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* a temperaturas dinámicas (4-7°C/12h, 22°C/8h, 30°C/4h) en queso ranchero (Replica 1)

El abuso de temperatura es frecuente, sobre todo en negocios del tipo informal, o de establecimientos donde los requerimientos de calidad no son altos o rigurosos, tal es el caso de los mercados públicos. Con lo observado en este estudio se prueba que esta es una práctica que incrementa el riesgo al consumidor, y que incluso afecta la calidad del producto, disminuyéndosela.

8.4.2 Comportamiento de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en queso ranchero a diferentes niveles de pH y concentración de NaCl

En primera instancia a 4°C al no ser una bacteria psicrótrofa, *Salmonella* en todas las condiciones a esta temperatura mostró tendencia a la inactivación. En la Figura 13, se observa que a medida que disminuye el pH, la inactivación que tiene el patógeno es más rápida. Esta observación fue respaldada por el análisis de varianza que mostró que el comportamiento de este patógeno, se ve influenciado por el pH, más que por la concentración de sal, y que no existe un efecto significativo de la interacción entre los factores.

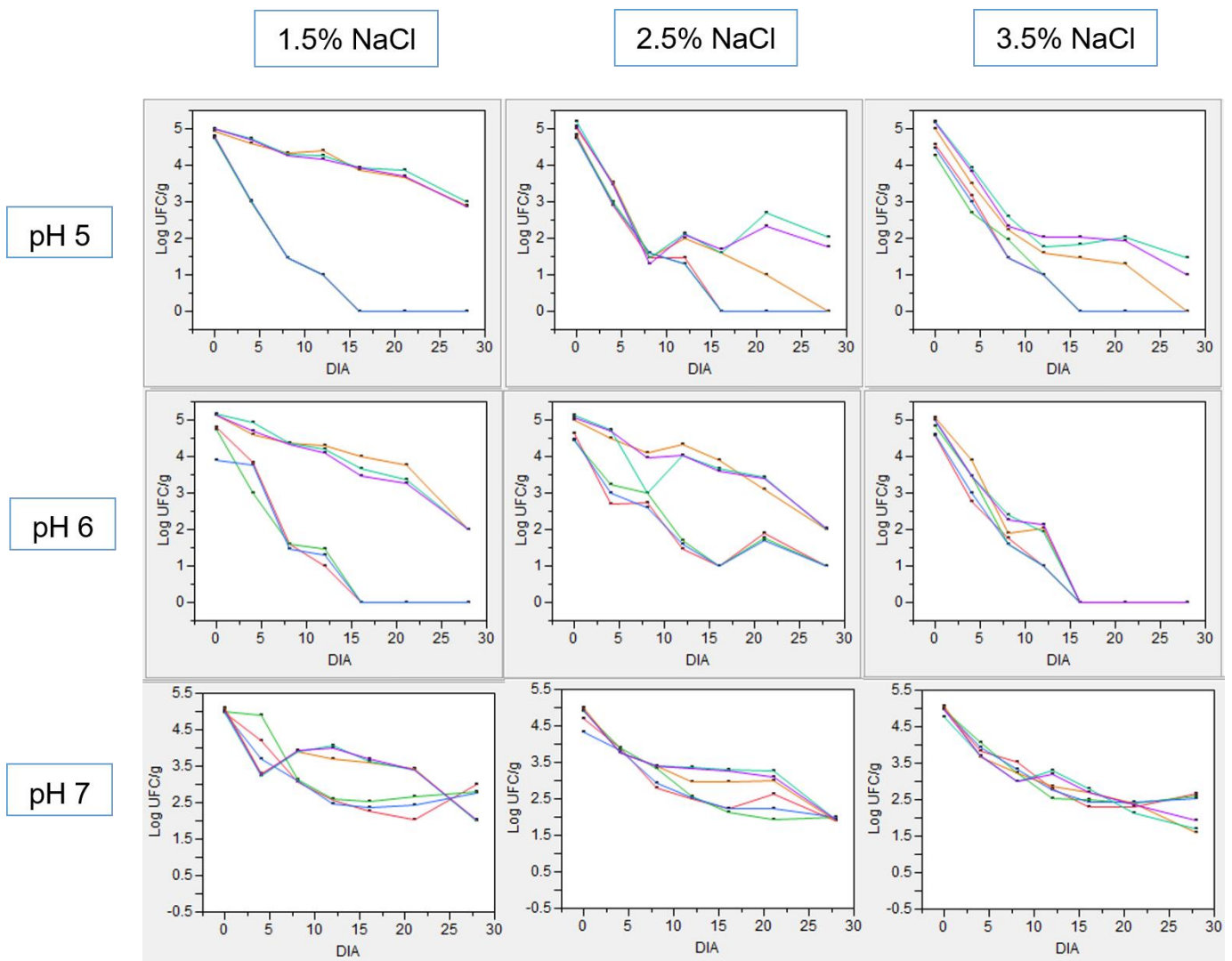


Figura 13. Comportamiento de *Salmonella* en queso ranchero a diferentes condiciones de pH y % de NaCl almacenadas a 4°C

Puede observarse que en algunos casos, el patógeno no se logró inactivar en su totalidad, pero a pH cercanos a la neutralidad esta muerte será más lenta, pudiendo el patógeno sobrevivir un lapso mayor, inclusive hasta el momento del consumo por lo que este alimento representa un riesgo a la salud del consumidor.

Cuando el queso se almacena a 4°C, *L. monocytogenes* es conocido como un patógeno que puede desarrollar en temperaturas de refrigeración (Angelidis *et al.*, 2010), En el presente trabajo el desarrollo del patógeno sólo se observó cuando el pH inicial del queso fue de 7 (Figura 14), mientras que a otros valores de pH estudiados el patógeno mostró una tendencia a la inactivación. Dejando en claro que el pH, es el factor con más influencia sobre el comportamiento del patógeno, esto respaldado por el análisis de varianza, el

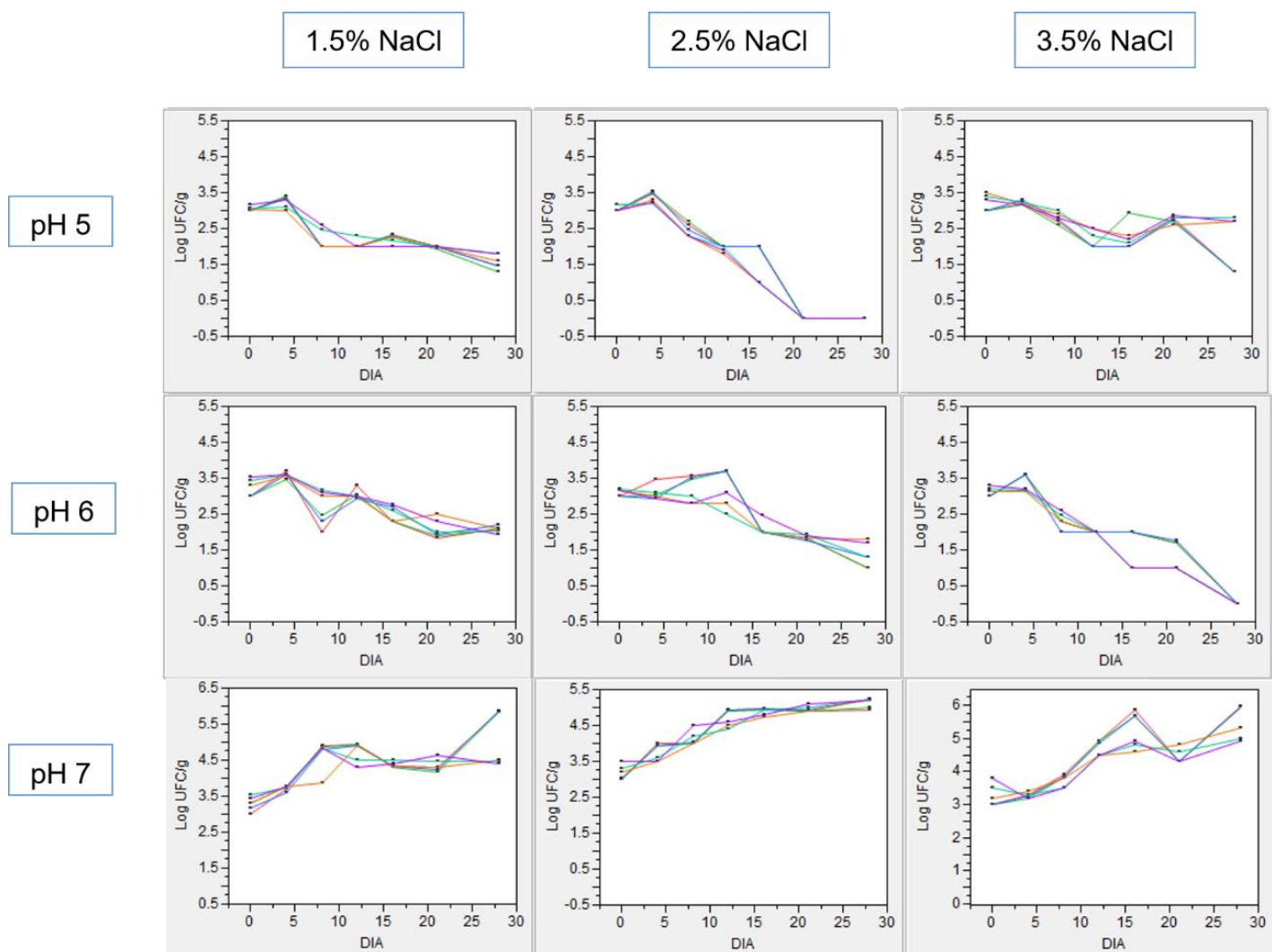


Figura 14. Comportamiento de *L. monocytogenes* en queso ranchero a diferentes condiciones de pH y % de NaCl almacenadas a 4°C

cual resalta que a menor pH, mayor será la velocidad de inactivación, independientemente de la concentración de NaCl. Lo que significa que el pH en este alimento puede representar un factor que resulta inhibitorio para la bacteria y que solamente bajo las condiciones ideales, lograra soportar el desarrollo de este patógeno.

Finazzi *et al.* (2011), afirman que la habilidad para desarrollar de *L. monocytogenes* a diferentes temperaturas está estrictamente correlacionado con el pH del queso. Por su parte Genigeorgis *et al.* (1991) mencionan que en quesos frescos mientras no exista una elevada cantidad de microbiota competitiva, alto pH y baja salinidad, el patógeno puede desarrollar aún en bajas temperaturas.

Solano-López *et al.* (2000), menciona que una vez que *L. monocytogenes* sobrevive al proceso de elaboración (queso manchego) es probable que pudieran sobrevivir o desarrollar a temperaturas de refrigeración y Melo *et al.* (2015), menciona que al haber dicha adaptación previa, es capaz de sobrevivir a diversos ambientes estresantes (pH letal, salinidad alta, bajas temperaturas).

Cabe mencionar que el efecto de la temperatura de refrigeración, logra afectar en mayor medida el comportamiento de *Salmonella* que al de *L. monocytogenes* ya que: 1) En la mayoría de los casos *Salmonella* logró inactivarse totalmente y 2) Al comparar las velocidades de inactivación las estimadas para *Salmonella* fueron de mayor magnitud que las de *L. monocytogenes*.

Por ultimo cabe resaltar que en las pruebas realizadas en los quesos a 4°C, al día 21 ya se apreciaban signos de deterioro en el alimento.

En el queso inoculado con *Salmonella* y almacenado a 22°C, se observó desarrollo del patógeno en la mayoría de los casos con excepción del alimento que contiene 3.5% de sal (Figura 15). La concentración de NaCl es el factor que tiene mayor influencia sobre el comportamiento del patógeno ($p > 0.05$). Los datos muestran que esto sucede hasta 2 o 3 Log UFC/g en 72 horas.

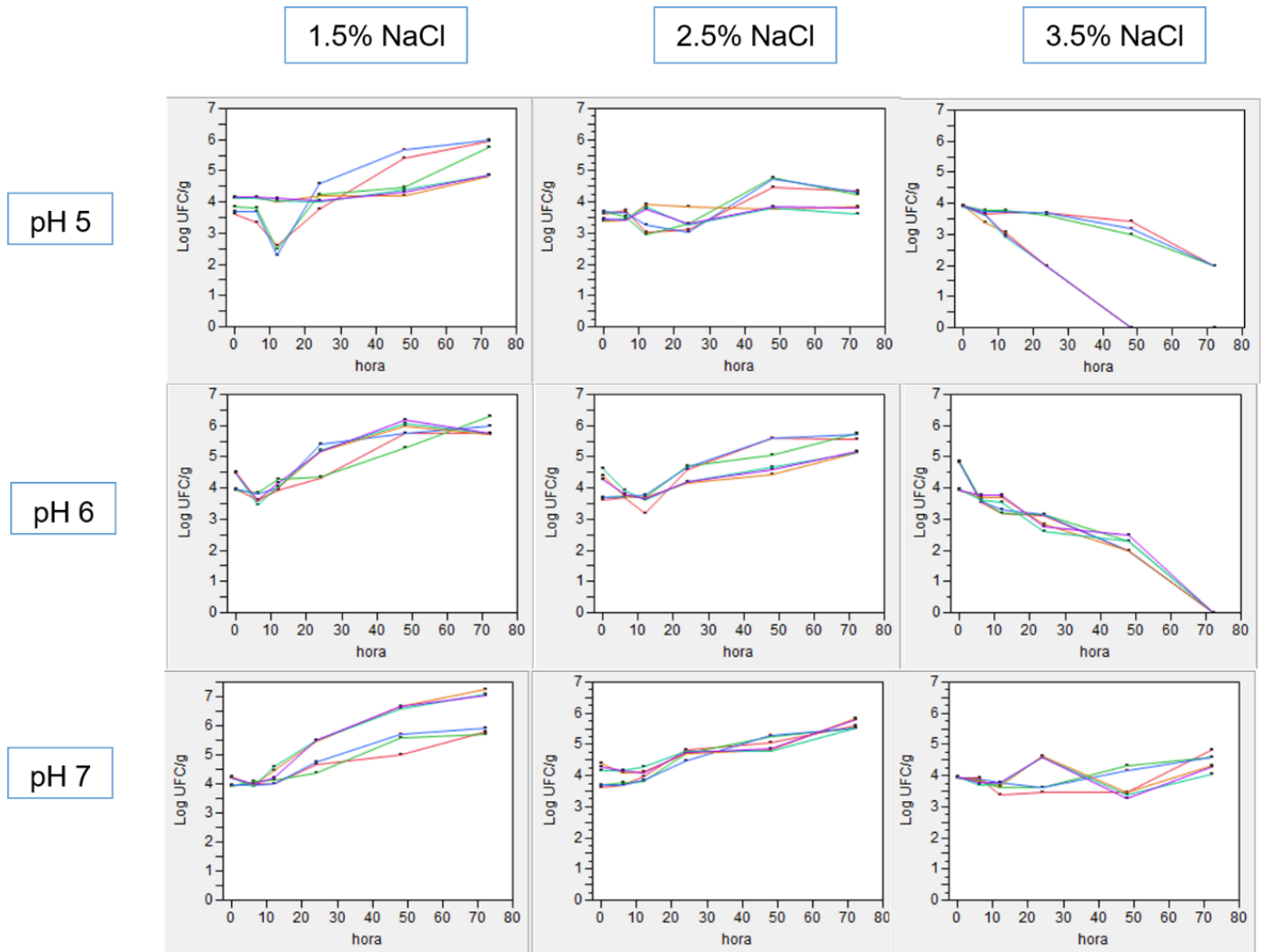


Figura 15. Comportamiento de *Salmonella* en queso ranchero a diferentes condiciones de pH y % de NaCl almacenadas a 22°C

Lo anterior, coincide según Kasrazadeh *et al.* (1994) indican que al igual que *L. monocytogenes*, se atribuye a la baja concentración de sales, alto pH y baja concentración de microbiota competitiva, por ello se asegura que *Salmonella*, sea capaz de tener un buen y rápido desarrollo.

Shrestha *et al.* (2011), mencionaron que la velocidad de desarrollo de *Salmonella* en queso Cheddar se ve incrementada a medida que aumenta la temperatura, y que la velocidad de inactivación se modifica en la medida en la que la concentración de sal cambie y que el pH del queso no tiene efecto significativo, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

L. monocytogenes, en queso ranchero y almacenado a 22°C, muestra un comportamiento heterogéneo y un tanto complejo. Este comportamiento puede observarse en la Figura 16, donde se aprecia que a pH inicial de 7, el patógeno logra desarrollar, lo que no ocurre en el alimento ajustado a pH 5 y 6.

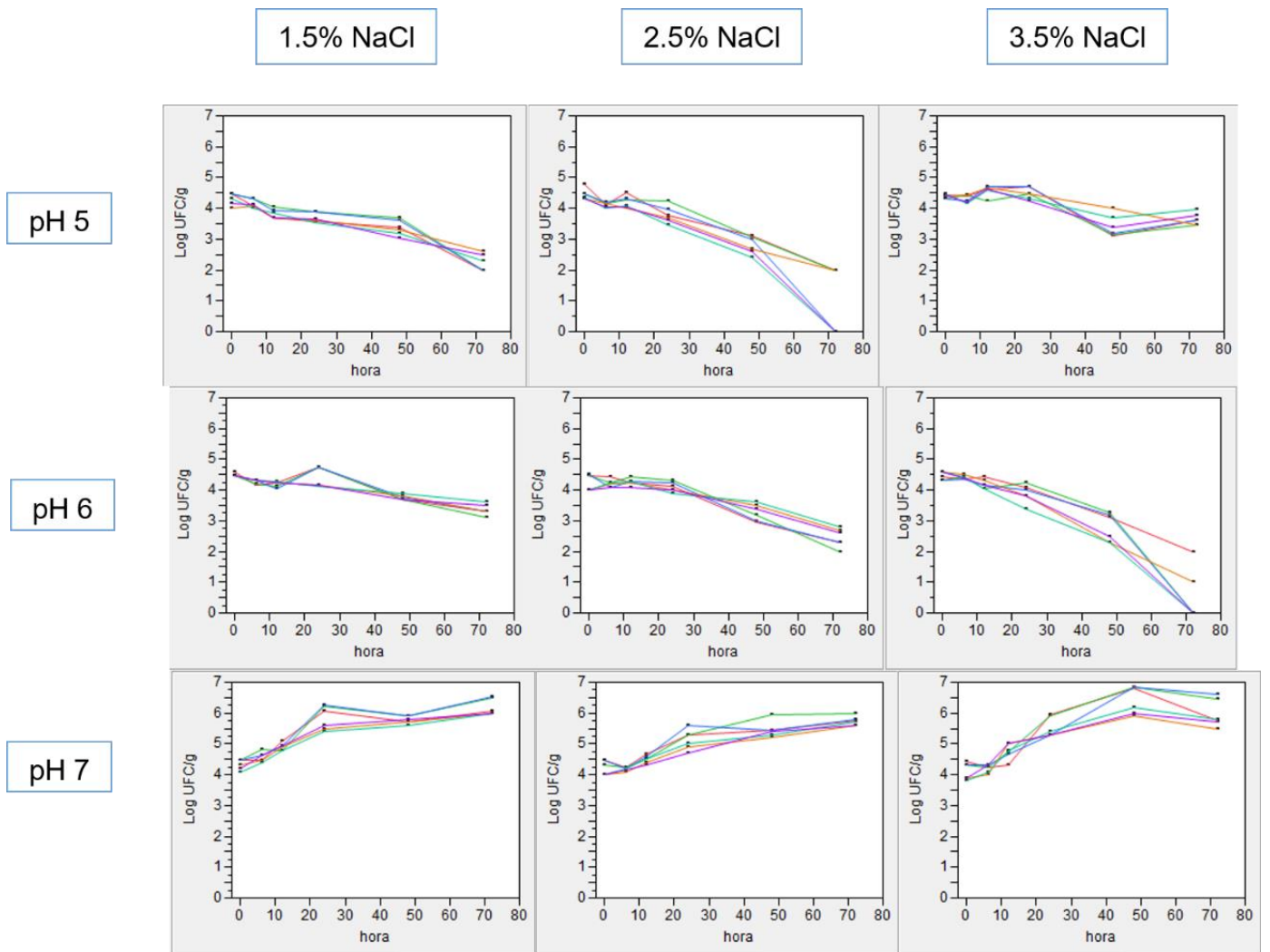


Figura 16, Comportamiento de *L. monocytogenes* en queso ranchero a diferentes condiciones de pH y % de NaCl almacenadas a 22°C

El análisis de varianza destaca que el pH logra tener un efecto sobre el comportamiento del patógeno; a mayores valores de pH la sobrevivencia y el desarrollo se ve favorecido. La concentración de NaCl también tiene un efecto sobre el comportamiento ($p > 0.05$), el cual indica que a mayor concentración de NaCl se favorece la inactivación de *L. monocytogenes*.

Ambos factores tienen efecto sobre el patógeno, no así la interacción, esto concuerda con Solano-López *et al.* (2000), quienes observaron que en queso manchego, donde el pH (% ácido láctico) y el porcentaje de NaCl, a temperatura de 20°C tiene un efecto negativo sobre el comportamiento de *L. monocytogenes*.

Shrestha *et al.* (2011) también concluyen que el pH y la concentración de NaCl juntos, al igual que la actividad de cultivos iniciadores contribuyen a la inhibición de *L. monocytogenes*.

En la regulación europea (EC) No 2073/2005, (EC) No 1441/2007, se menciona que hay un límite permisible de *L. monocytogenes* (máximo 100 UFC/g en alimentos listos para el consumo). Angelidis *et al.* (2010), hacen hincapié en el carácter psicrótrofo de *L. monocytogenes*, ya que puede proliferar bajo las condiciones de almacenamiento de los alimentos como el queso ranchero (considerados alimentos listos para el consumo), y es por ello que estos autores en su trabajo demuestran que aun en este límite permisible, y aun en las condiciones correctas de almacenamiento *L. monocytogenes* es capaz de desarrollar, convirtiéndose en un riesgo para la población.

Respecto a la condición de 4°C, los datos muestran que el pH tuvo un efecto significativo, sobre el comportamiento de los microorganismos, y el comportamiento de las BAL también puede estar influenciando al patógeno

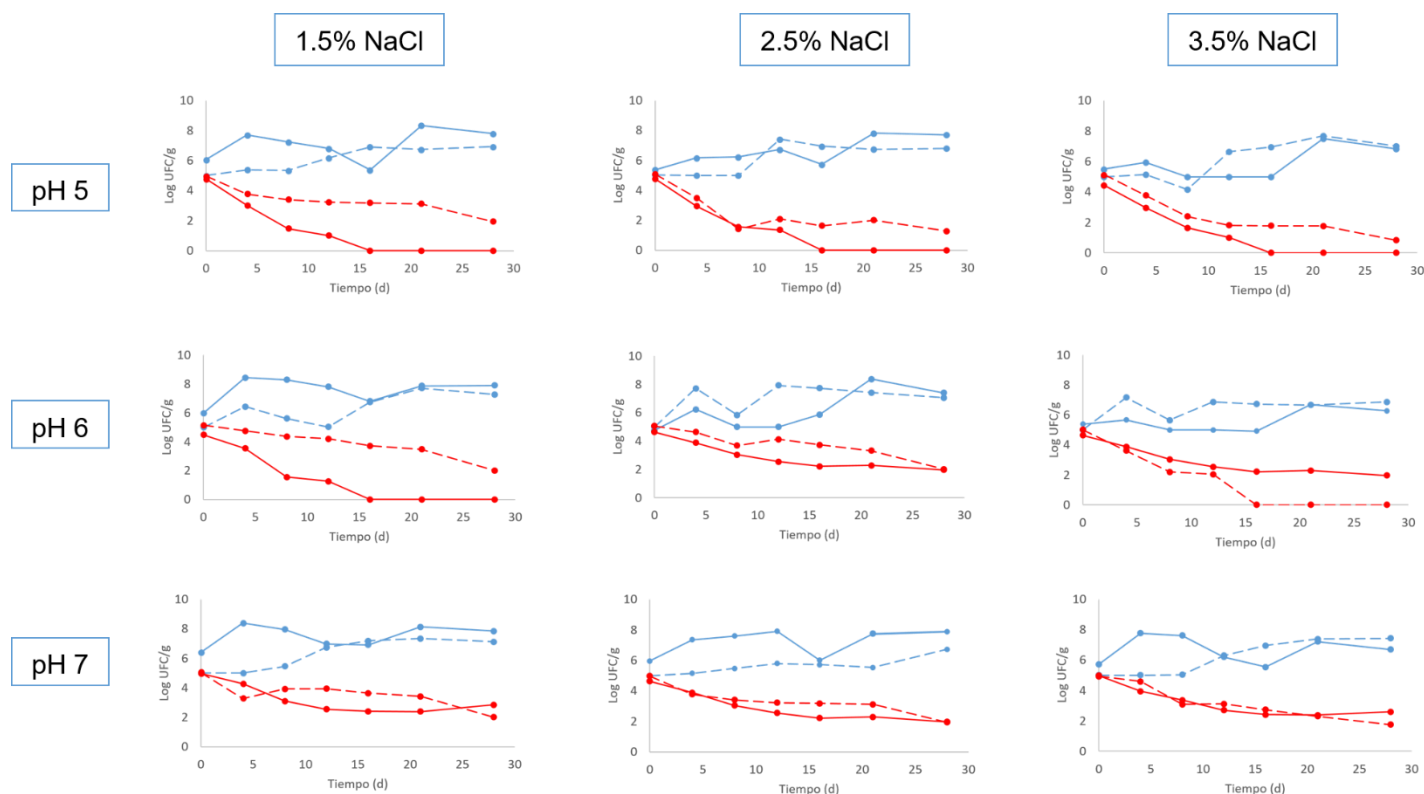


Figura 17. Comportamiento de BAL y *Salmonella* en queso ranchero a diferentes condiciones de pH y % de NaCl almacenadas a 4°C

(Figura 17). El metabolismo de las BAL puede producir ácidos orgánicos que acidifican el medio y puedan afectar el comportamiento de los patógenos.

Diversos autores (Genigeoris *et al.*, 1991; Uhlich *et al.*, 2006; Soni *et al.*, 2010; Leggett *et al.*, 2012) mencionan que la ausencia de cultivos iniciadores en queso fresco, el pH elevado hace de esta matriz un buen sustrato para poder mantener el desarrollo de *L. monocytogenes* inclusive a 4°C, lo que sólo ocurrió para los quesos que tuvieron pH 7 como valor inicial, y aun cuando no se le añaden cultivos iniciadores (Figura 18).

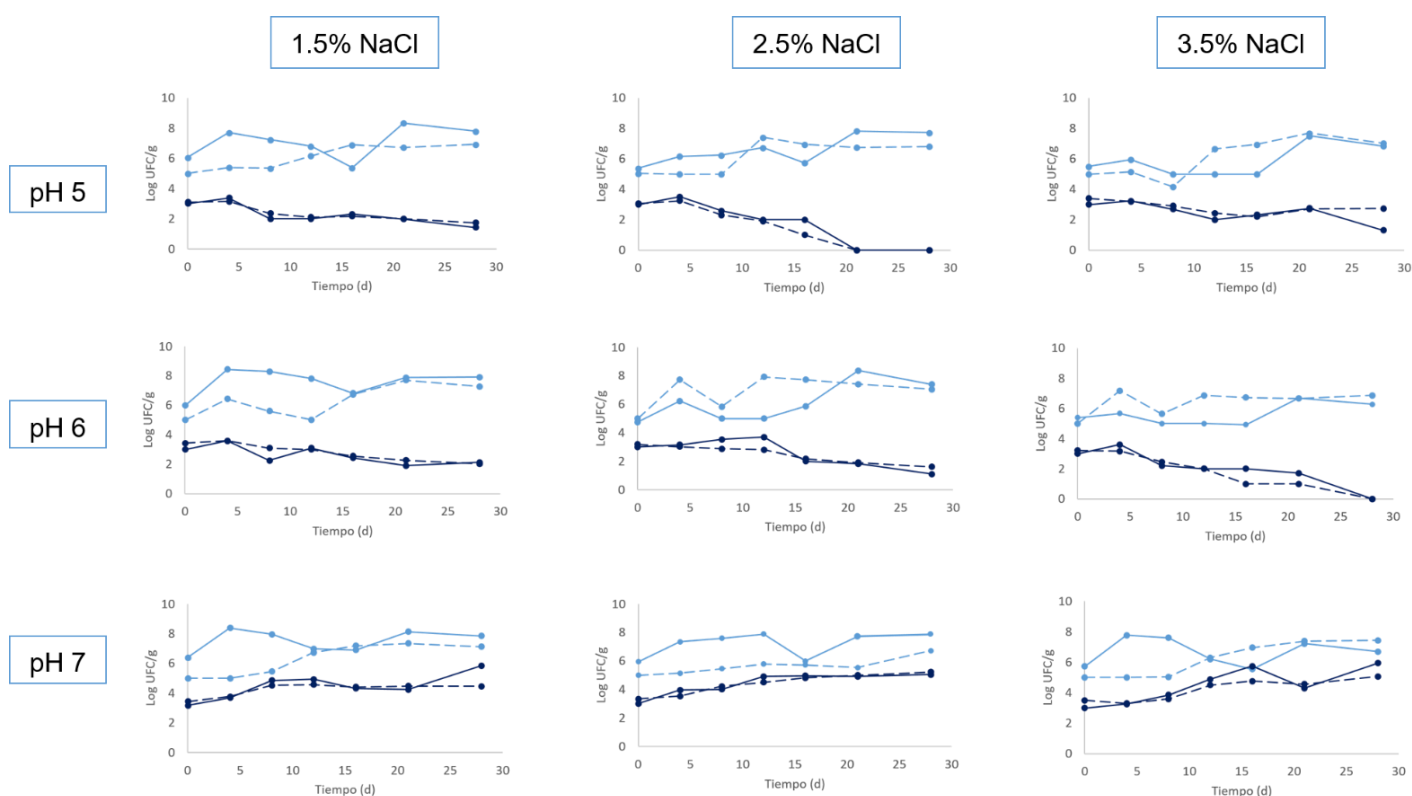


Figura 18. Comportamiento de BAL y *L. monocytogenes* en queso ranchero a diferentes condiciones de pH y % de NaCl almacenadas a 4°C

Las BAL como se mencionó anteriormente son microbiota nativa de la leche y por tanto están presentes en los productos lácteos. En este trabajo, estos microorganismos se encontraron en una concentración de 5 Log UFC/g y en algunos existió relación entre el aumento de su población con la inhibición de *L. monocytogenes*, aunque los autores que antes mencionados contradicen que la microbiota nativa no tiene un efecto sobre *L. monocytogenes*.

A 22°C se observaron resultados diferentes, ya que la actividad metabólica de las BAL es muy similar al desarrollo de *Salmonella* (Figura 18). Y por lo tanto no se puede hacer la correlación de la actividad metabólica de BAL con el comportamiento de este patógeno

Angelidis *et al.* (2010), notó que la velocidad de inactivación de *L. monocytogenes* almacenado a 22°C era mayor, comparado con otras temperaturas de almacenamiento y le atribuyen a la actividad metabólica elevada de las poblaciones existentes en el alimento durante el experimento, sin embargo, el estudio se realizó: en un queso madurado de pasta

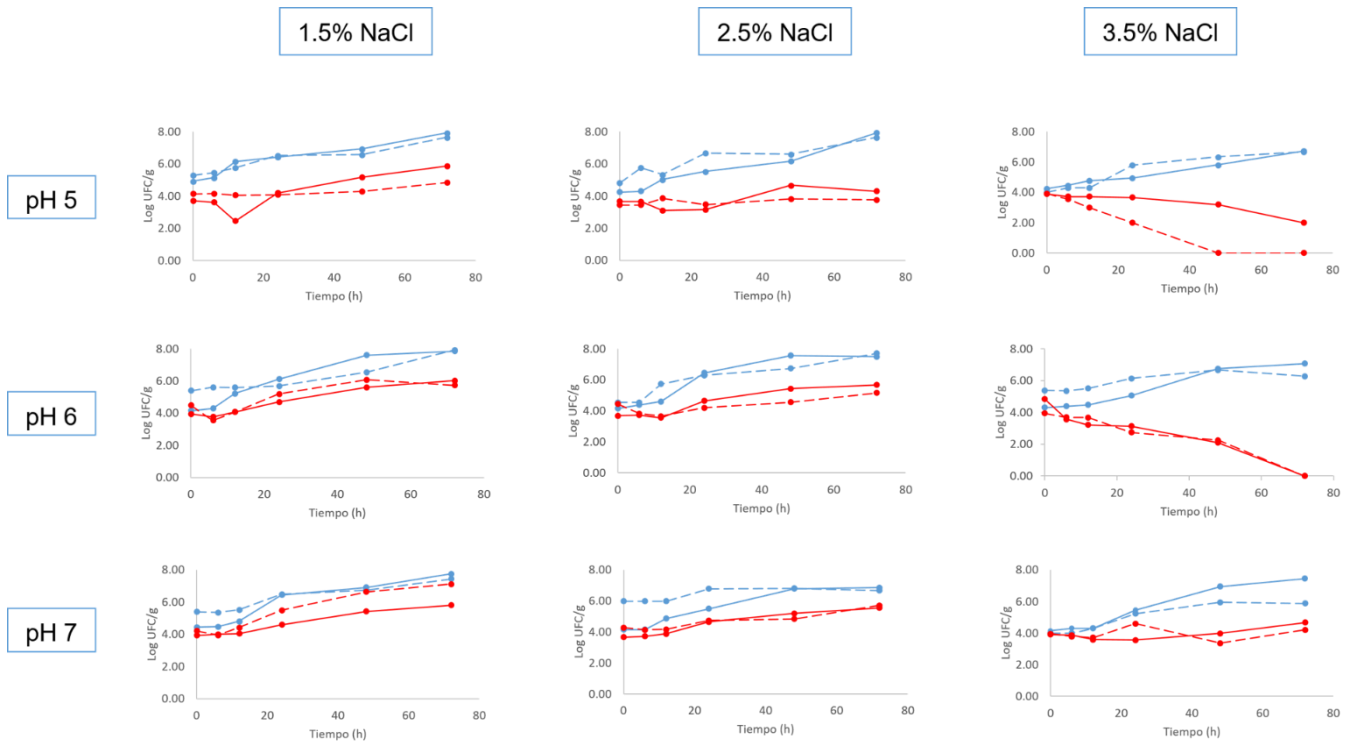


Figura 19. Comportamiento de BAL y *Salmonella* en queso ranchero a diferentes condiciones de pH y % de NaCl almacenadas a 22°C

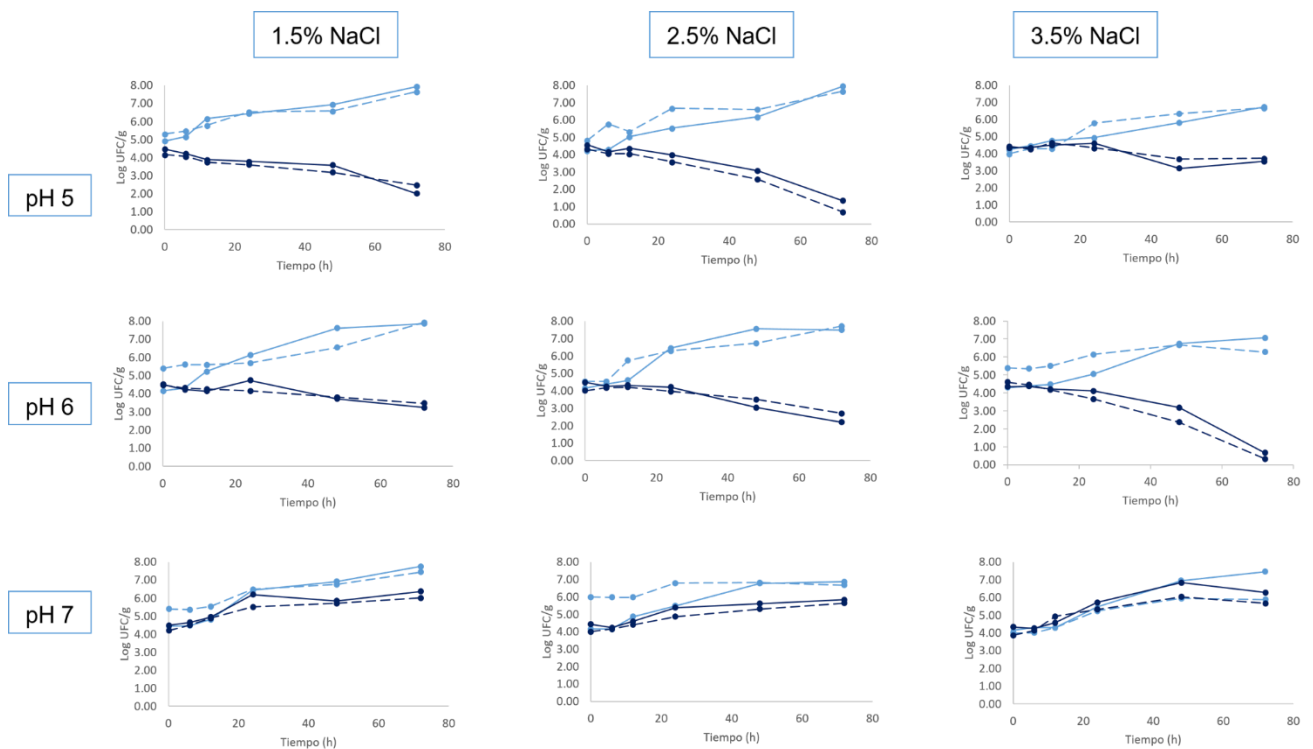


Figura 20. Comportamiento de BAL y *L. monocytogenes* en queso ranchero a diferentes condiciones de pH y % de NaCl almacenadas a 22°C

dura, con un pH de 5 y A_w de 0.92, y en estas condiciones *L. monocytogenes* pudo sobrevivir, tal como los resultados que arroja nuestro estudio, que si bien en el estudio de Angelidis *et al.*, no se cuantificó la microbiota nativa, son los resultados mostrados en este trabajo, se puede complementar esta aseveración, donde relacionan la actividad metabólica con la disminución del patógeno (Figura 20).

En la Figura 21 se presentan los cambios en el pH y ácido láctico durante la cinética de desarrollo llevada a cabo a 4°C. Se observa que a medida de que el pH inicial es menor, la concentración de ácido láctico a lo largo de la cinética se incrementa. En las cinéticas llevadas a cabo a 22°C, se observa la misma tendencia, con la salvedad de que a pesar de la acidificación del medio, la concentración de ácido láctico no logró ser tan alta como en la cinética de 4°C (Figura 22). Según lo observado en el experimento de temperaturas dinámicas, a la concentración de 0.4% de ácido láctico empieza a observar un efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes*; sin embargo, bajo las condiciones de ésta serie de experimentos, no se observa el mismo efecto en estas cinéticas, lo que sugiere que no es solo este factor lo que inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes*.

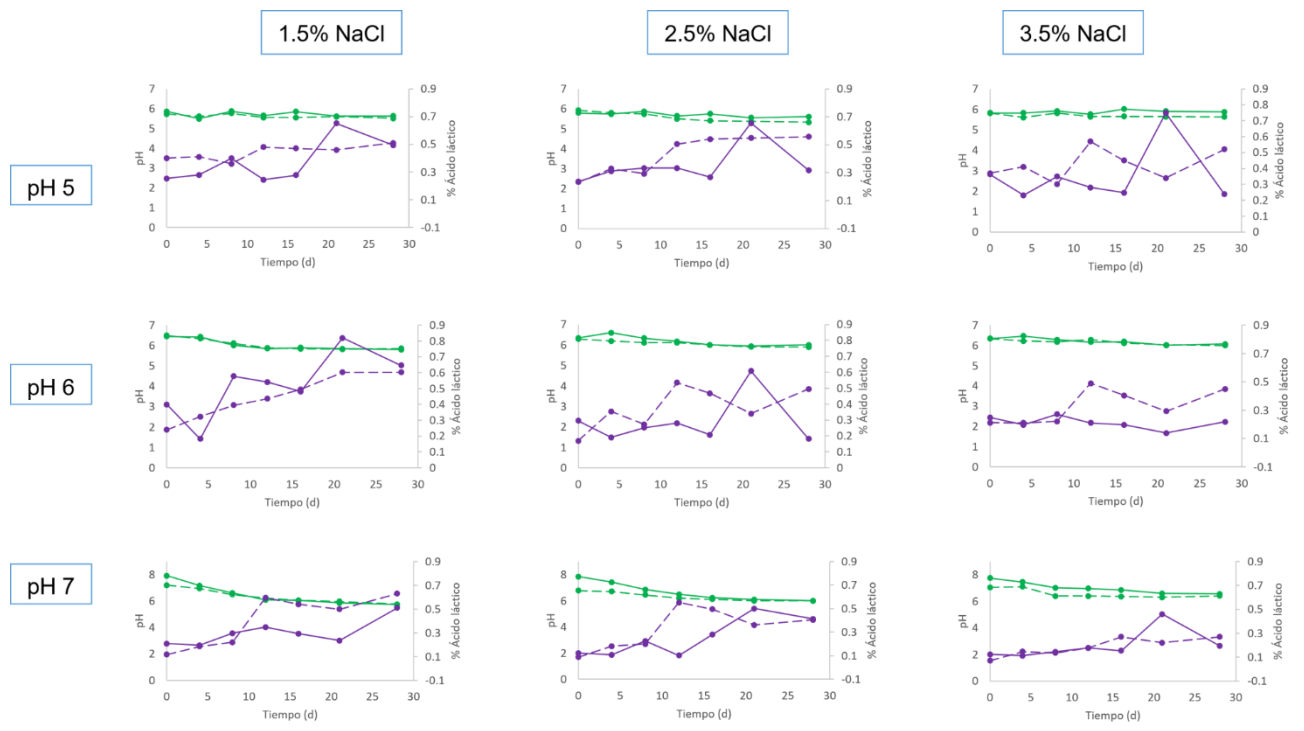


Figura 21. pH y acidez del queso ranchero, a lo largo de la cinética a 4°C

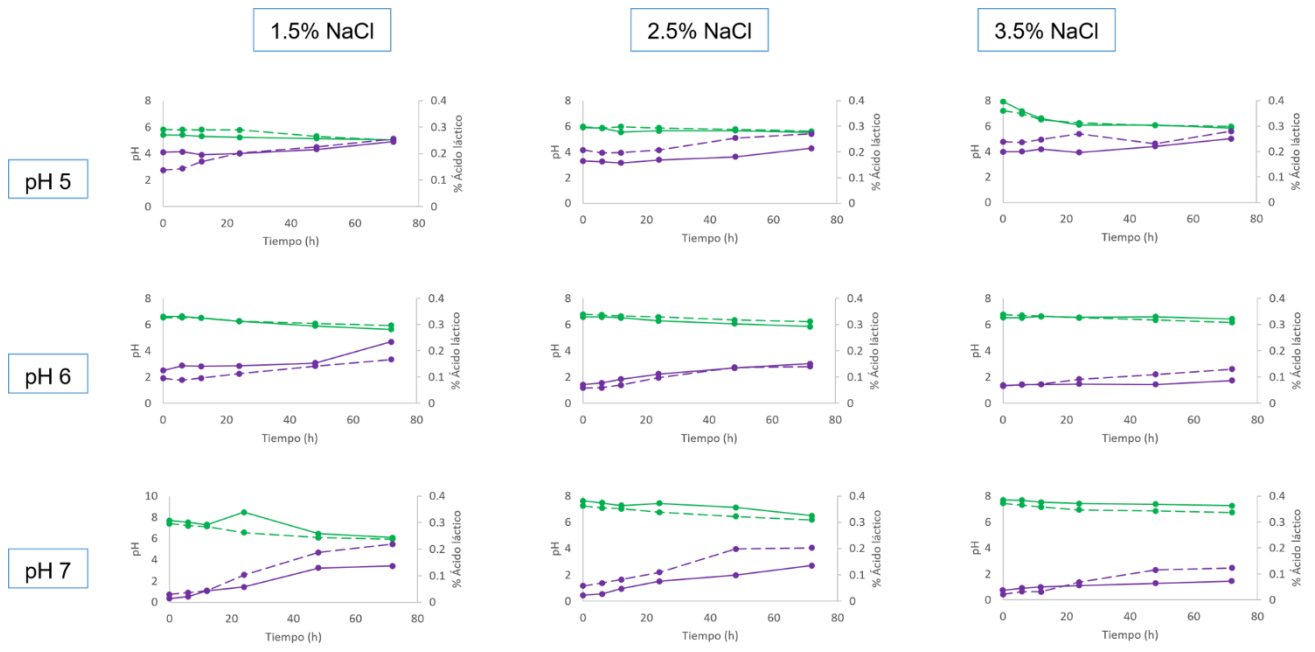


Figura 22. pH y acidez del queso ranchero, a lo largo de la cinética a 22°C

Solano-López *et al.* (2000) observaron que en queso manchego con 2.9% de NaCl, pH 5.5 y % ácido láctico de 1.06, se logró reducir 1 Log UFC/g, de *L. monocytogenes*, estos parámetros si bien no coinciden con lo que se encontró en este estudio, y el queso es distinto, los resultados mostrados en este trabajo logran coincidir con los parámetros y la reducción del patógeno. A esto se le puede sumar la aseveración de dicho autor que menciona que esta bacteria puede sobrevivir a concentraciones >0.5% ácido láctico.

Antwi *et al.* (2007) y Schvartzman *et al.* (2010), sugieren que el efecto inhibitorio del ácido láctico no disociado y el pH de los alimentos sobre los microorganismos tiene relación con la matriz alimentaria y su capacidad de amortiguación o regulación.

En este trabajo sólo se analizó el ácido láctico, sin embargo, Mc Mahon *et al.* (2014), mencionan que la concentración de otros ácidos orgánicos en el queso pueden incrementar durante el almacenamiento, y que incluso a menor cantidad de sal contenida en los quesos mayor será la concentración de ácido láctico, esto último no se observó en este estudio.

8.4.3 Estimación de parámetros cinéticos del comportamiento de los microorganismos en queso ranchero

Los datos obtenidos de los experimentos anteriores se analizaron mediante el programa de modelado DMFit versión 2.0 (<http://www.combase.cc/index.php/en/tools>), ajustándose al modelo de Baranyi y Roberts (D-Model) o al de Gompertz.

Desafortunadamente en la mayoría de las curvas de desarrollo microbiano no fue posible obtener los parámetros cinéticos como la velocidad (inactivación o desarrollo), población máxima, duración de fase Lag, ajuste de los datos al modelo y R^2 , empleando el mismo modelo matemático, e incluso en cada caso (modelaje de cada cinética) algunos parámetros no pudieron ser obtenidos.

Es por esto que al graficar los resultados de cada una de las réplicas de los experimentos, y observarse una heterogeneidad en el comportamiento, se

determinó que no es posible realizar un ajuste de los datos a un modelo matemático, ya que al graficar una media se estaría modelando o graficando un valor que no corresponde a los valores obtenidos.

Por esta misma razón no se pudo determinar matemáticamente qué modelo (Baranyi o Gompertz) ajusta a una mejor manera los datos que se están modelando.

Sin embargo, mediante la comparación gráfica, se puede observar que el modelo de Gompertz ajusta de una manera más adecuada a los datos que se requieren modelar. Independientemente que en algunos datos no se puede obtener el ajuste al modelo, o la R^2 , o ambos valores resultan ser de un orden al cual no se pudieran tomar en cuenta como buen ajuste, gráficamente se observa lo contrario.

Al no concretar un modelo primario, por las razones antes descritas, no fue posible generar un modelo secundario.

Para el caso de la condición dinámica de temperaturas, ocurre una situación similar, al no contar con un modelo que no ajusta al comportamiento exhibido por los microorganismos en este estudio. En adición en la página del ComBase, se puede encontrar un programa capaz de predecir el comportamiento de microorganismos a determinadas condiciones y en diferentes matrices (http://browser.combase.cc/ComBase_Predictor.aspx?model=1#), en el cual puede simularse temperaturas dinámicas, y en el cual los valores predichos tampoco logran coincidir con los valores encontrados en este estudio.

En conclusión, debido a que los datos no son lo suficientemente robustos, homogéneos y concisos, no fue posible ajustar los datos a un modelo en particular, y por lo tanto no es posible proponer un modelo matemático capaz de predecir el comportamiento de cualquiera de los dos microorganismos en estudio en queso ranchero a las diferentes condiciones planteadas.

9. CONCLUSIONES

1. Los contenidos de los grupos indicadores encontrados en los quesos muestran que los quesos provenientes de mercados públicos reflejan una mayor incidencia en las malas prácticas higiénicas que los quesos de supermercado.
2. La presencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en queso ranchero representa un riesgo a los consumidores, siendo mayor el riesgo de exposición a *Salmonella* en quesos comercializados en mercados.
3. La exposición del queso a condiciones dinámicas de temperatura propicia el desarrollo de *Salmonella* en queso ranchero. *L. monocytogenes* no fue capaz de desarrollar en las condiciones evaluadas y la tendencia a la inactivación que se observó puede estar asociada a los cambios en el pH y acidez del alimento.
4. El almacenamiento del queso a 4°C, no favorece el crecimiento de los patógenos, incluso promueve su inactivación, que se favorece a medida que el pH del alimento es menor.
5. La exposición a 22°C del queso, propicia el desarrollo de *Salmonella*, el cual se ve influido por la concentración de NaCl; mientras que el comportamiento de *L. monocytogenes*, depende significativamente tanto del pH como de la concentración de NaCl.
6. El modelo de Gompertz, se eligió para estimar los parámetros cinéticos debido a que los datos obtenidos se ajustan de una mejor manera a esta ecuación.

10. REFERENCIAS

- Alcazar-Montañez, C.D., Rubio-Lozano, M.S., Núñez-Espinosa, F. y Alonso-Morales, R.A., 2006, Detección de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se expenden en vía pública en la ciudad de México, Vet. Méx., 37 (4), P. 417-429.
- Angelidis, A.S., Boutsouki, P., Papageorgiou, D.K., 2010, Loss of Viability of *Listeria monocytogenes* in contaminated processed cheese during storage at 4, 12 and 22°C, Food Microbiology, 27, 809-818.
- Avelino, F.F., Báez, A.D., Caltzalco, B.M., Moreno, S.L.I., y Castañeda, R.E.I. 2013. Evaluación de la calidad microbiológica de quesos frescos expendidos en diferentes mercados de la ciudad de Puebla. Memorias del XV Congreso internacional de inocuidad de alimentos y XXX Reunión nacional de microbiología, higiene y toxicología de los alimentos, Guadalajara, Jalisco, México.
- Ayala-López, O., Arvizu-Medrano, S.M., González-López M.C., Álvarez-Mayorga, B.L., Hernández-Iturriaga, M. y Pérez-Muñoz F. R. 2014. Detección de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en el proceso de producción de quesos frescos. Memorias del XVI Congreso internacional de inocuidad de alimentos y XXXI Reunión nacional de microbiología, higiene y toxicología de los alimentos, Nuevo Vallarta, Nayarit, México
- Bachmann, H. P. y Spahr, U., 1995. The fate of potentially pathogenic bacteria in swiss hard and semihard cheeses made from raw milk. J. Dairy Sci., 78: 476-483.
- Balaban, N. and Rasooly, A., 2000, Staphylococcal enterotoxins, International Journal of Food Microbiology, V.61, p. 1-10.

- Baldera-Zubeldia, B., Nieto-Jimenez, M., Valenzuela-Claros, M.T., Mariscal-Andr J.L. and Martin-Olmedo, P., 2016, Effectiveness of the cold chain control procedure in the retail sector in Southern Spain, *Food Control* Vol.59 p. 614-618.
- Bishop, J.R., and Smukowski, M., 2006, Storage temperatures necessary to maintain cheese safety, *Food Protection Trends*, Vol. 26 No.10 p. 714-724.
- Buchanan, R., Stahl, H. y Whiting, R., 1989. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J.Food Prot.*, 52 (12): 844-851.
- Castro-Castillo, G., Martínez-Castañeda, F. E., Martínez-Campos, A. R. y Espinoza-Ortega, A., 2013, Caracterización de la microbiota nativa del queso Oaxaca tradicional en tres fases de elaboración. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, Caracas, v. 33, p. 105-109, 2013.
- El Galiou, O., Zantar, S., Bakkali, M., Laglaoui, A., Centeno, J.A. y Carballo J, 2015, Chemical and microbiological characteristics of traditional homemade fresh goat cheeses from northern Morocco, *Small Ruminant Research*, V. 129, 108-113.
- EC, 2005. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for food stuffs. *Off. J. Eur. Union* 338 (1), 1–26.
- EC, 2007. Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007, amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for food stuffs. *Off. J. Eur. Union* 1332, 12–29.
- EC, 2013a. RASFF Portal, Milk and Milk Products, Pathogenic Microorganisms Retrieved October 25, 2013, from http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm.

EC, 2013b. Food Additives Database Retrieved December 18, 2013, from <https://webgate>.

ec.europa.eu/sanco_foods/main/?sector=FAD&auth=SANCAS.

FAO/OMS, 2004, Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para consumir. Informe técnico, Serie sobre evaluación de riesgos microbiológicos

Farkye, N. Y. and Vedamuthu, E.R., 2002, Chapter 10: Microbiology of soft cheeses, Dairy microbiology handbook, the microbiology of milk and milk products, 3rd Edition, Wiley-Interscience, U.S.A.

Fernández, E. E., 2008, Microbiología e inocuidad de los alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro México.

Fernández, R. E, Mota, G. L. y Nájera, S. G., 2013, Intoxicación estafilocócica, en Riesgos asociados al consumo de alimentos, 1ª edición, Universidad de Guadalajara, México, p. 135-158.

Finazzi, G., Daminelli, P., Serraino, A., Pizzamiglio, V., Riu, R., Giacometti, F., Bertasi, B., Losio, M.N., and Boni P., 2011, Behaviour of *Listeria monocytogenes* in packaged wáter buffalo mozzarella cheese, Letters in applied microbiology, 53, 364-370.

Garcia, I. G., 2006, Caracterización fisicoquímica de diversos tipos de quesos elaborados en el valle de Tulancingo Hidalgo con el fin de proponer normas de calidad, Tesis para obtener el título de Ingeniero Agroindustrial, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México

Genigeorgis, C., Carniciu, M., Detulescu, D., and Farver, T.B., 1991, Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 to 30°C, Journal of Food Protection, Vol. 54, No. 9, 662-668

- Gibson, A. M., bratchell, N. and Roberts, T.A., 1988. Predicting microbial growth: growth responses of *Salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperatura, *International Journal of Food Microbiology*, 6 (1988) 155-178 155 Elsevier
- González-Montiel, L. y Franco-Fernandez, M.J., 2015, Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña, *Braz. J. Food Technol.*, Campinas v. 18, n. 3, p. 250-257
- Gould, H.L., Mungai, E., and Behraves, C.B., 2014, Outbreaks Attributed to Cheese: Differences Between Outbreaks Caused by Unpasteurized and Pasteurized Dairy Products, United States, 1998–2011, *Foodborne Pathogens And Disease*, Volume 11, Number 7, p. 545-551.
- Guzmán-Hernández, R.L., Morales-Estrada, A.I., Islas-Olivares, M.I., Contreras-Rodríguez, A., López-Merino, A. y Hernández-Vélez. R.M. 2011. Evaluación microbiológica de quesos frescos del estado de Tabasco, *Memorias del XIII Congreso internacional de inocuidad de alimentos y XVIII Reunión nacional de microbiología, higiene y toxicología de los alimentos*, Puerto Vallarta, Jalisco, México.
- Hernández, V.J. 2013, Determinación de la calidad sanitaria de quesos artesanales que se venden en el mercado popular de la ciudad de Zacatlán, Puebla durante el mes de noviembre 2012, Tesis para obtener el título de Químico Farmacobiólogo. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
- Kasrazadeh, M., Genigeorgis, C., 1994, Potential Growth and Control of *Salmonella* in hispanic type soft cheese, *International Journal of Food Microbiology*, 22, 127-140.

- Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P. and Drosinos, H.S., 2010, Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm, *Food control* 21, p.805-815, Greece
- Langer, A.J., Ayers, T., Grass, J., Lynch, M., Angulo, F.J and Mahon, B.E., 2012, Nonpasteurized dairy products, disease, outbreaks and state laws-US, 1993-2006, *Emerging infectious, diseases*, Vol. 18, No.13, United States
- Lee, H., Kim, K., Lee, S., and Yoon, Y., 2014, Kinetic behavior of *Staphylococcus aureus* on cheese as a function of water activity and temperature, *Journal of Dairy Research*, Vol. 82, 64–69
- Leggett, L.N., Tomasula, P.M., Van Hekken, D.L., Porto-Fett, A.C.S., Shoyer, B., Renye, J.A., Luchansky, J.B. and Farkye N., 2012, Effect of storage at 4 and 10°C on the growth of *Listeria monocytogenes* in and on queso fresco, *Journal of Food Safety*, 32, 236-245
- Leong, W.W., Geier, R., Engstrom, S. Ingham, S., Ingham, B., and Smukowski, M., 2014, Growth of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Staphylococcus aureus* on Cheese during Extended Storage at 25°C, *Journal of Food Protection*, Vol. 77, No. 8, Pages 1275–1288
- Liu, T., Liljebjelke, K., Bartlett, E., Hofacre, C., Sanchez, S., and Maurer, J.J., 2002, Application of Nested Polymerase Chain Reaction to Detection of *Salmonella* in Poultry Environment, *Journal of Food Protection*, Vol. 65, No. 8, Pages 1227–1232
- Lucero-Mejía, J.E., 2013, Investigación de *Vibrio* spp en mariscos expedidos en la ciudad de Puebla en temporada de cuaresma, Tesis para obtener el título de Químico Farmacobiólogo, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- Manfredi, E.A., Leotta, G.A. y Rivas, M., 2010, PCR múltiple para la detección de los genes sea, seb, sec, sed y see de *Staphylococcus aureus*. Caracterización de aislamientos de origen alimentario, Revista Argentina de Microbiología, N. 42, p, 212-215
- Martínez, C. L. y Martínez, G. E., 2013, *Listeria monocytogenes*, en Riesgos asociados al consumo de alimentos, 1ª edición, Universidad de Guadalajara, México, p. 269-298.
- Mc Mahon, D.J.; Oberg, C.J., Drake, M.A., Farkye, N., Moyes, L.V., Arnold, M.R. Ganesan, B., Steele, J., and Broadbent, J.R., 2014, Effect of sodium, potassium, magnesium, and calcium salt cations on pH, proteolysis, organic acids, and microbial populations during storage of full-fat Cheddar cheese, Journal of Dairy Science, Vol. 97, No.8, p.4780-4798.
- Melo, J., Andrew, P.W., and Faleiro, M.I., 2015, *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses, Food Research International, 67, 75-90
- Michanie, S., Medina, L., Ghiberto, D., Prosello, W., Alia, P., Coria, P., Compagnucci, O. y Gallo, J., 2001, Epidemiología de las enfermedades transmitidas por queso, Enfasis alimentación, Año VII, No. 2, Abril-Mayo.
- Moreno-Enriquez, R.I., Garcia-Galaz, A., Acedo-Felix, E., Gonzalez-Rios, H., Call, J.E., Luchansky, J.B., and Diaz-Cinco, M.E., 2007, Prevalence, Types, and Geographical Distribution of *Listeria monocytogenes* from a Survey of Retail Queso Fresco and Associated Cheese Processing Plants and Dairy Farms in Sonora, Mexico, Journal of Food Protection, Vol. 70, No. 11, P. 2596–2601
- NMX-F-150-S-1981. Alimentos para humanos. Determinación de cloruro de sodio en salmueras. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.

NOM-243-SSA1-2010, 2010, Productos y Servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. México.

Orozco-Ramirez, L., 1999, Algunos factores que afectan la inocuidad microbiana del queso Oaxaca durante su elaboración y almacenamiento, Tesis para obtener el grado de Maestro en ciencia y tecnología de alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro.

Padilla, S.R, Reyes, T.H, Bejarano, R.V, Riestra, T. MG, Soler, P.G, y Dávila, S. MN. 2014. Caracterización microbiológica de quesos frescos analizados en el laboratorio estatal de salud pública de Baja California. Memorias del XVI Congreso internacional de inocuidad de alimentos y XXXI Reunión nacional de microbiología, higiene y toxicología de los alimentos, Nuevo Vallarta, Nayarit, México

Parada-González, A.G., 2013, Comportamiento y acidotolerancia de *Salmonella* en jocoque durante su producción y almacenamiento, Tesis para obtener el grado de Maestro en ciencia y tecnología de alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro

Ramírez, L. C. y Vélez, R. J. F., 2012, Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad, Temas selectos de ingeniería de alimentos, Vol. 6 No. 2; p.131-148, UDLAP, México

Ramos-Izquierdo, B., Bucio-Galindo, A., Bautista-Muñoz, C., Aranda-Ibáñez, E. e Izquierdo-Reyes, F., 2009, Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical, Universidad y ciencia vol.25 no.2, p. 159-171

Romero-Castillo, P. A., Leyva-Ruelas, G., Cruz-Castillo, J.G. y Santos-Moreno, A., 2009, Evaluación De La Calidad Sanitaria De Quesos Crema Tropical Mexicano De La Región De Tonalá, Chiapas, Revista Mexicana de Ingeniería Química, Vol. 8, No. 1 p. 111-119

- Ratkowsky, A. R. (1991). Comparison of Arrhenius type and Bélehrádek type models for prediction of bacterial growth in foods. *J. Appl Bacteriol.*, 71:452- 459.
- Rodríguez, G. M. O., Márquez, G. M. y Hernández, M. C., 2013, *Salmonella*, en Riesgos asociados al consumo de alimentos, 1ª edición, Universidad de Guadalajara, México, p. 51-91.
- Rosado-Zarrabal, T.L., Corzo-González, H., Morales-Fernández, S.D., Velazquez-Méndez, A.M. y Wong-Villareal, A., 2013, Caracterización fisicoquímica de quesos étnicos del estado de Chiapas, *Ciencia UAT*. 8(1): p. 06-10
- Saltijeral, J.A., ALVAREZ, V.B. and GARCIA, B., 1999, Presence Of *Listeria* In Mexican Cheeses, *Journal of Food Safety* Vol. 19, p. 241 -247
- Schrma, D., Helliwell, N., Neto, L., and Faleiro, M.L., 2013, Adaptation of *Listeria monocytogenes* in a simulated cheese medium: effects on virulence using the *Galleria mellonella* infection model, *Letters in Applied Microbiology*, N.56 p-421-427.
- Schvartzman, M.S., Belessi, F. Butler, P. Skandamis and K. Jordan, 2010, Comparison of growth limits of *Listeria monocytogenes* in milk, broth and cheese, *Journal of Applied Microbiology* 109, 1790–1799
- Secchini, M.L., Aquili, V., and Sarais, I., 1995, Behavior of *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese in presence of *Lactococcus lactis*, *International Journal of Food Microbiology*, 25, 301-310.
- Shrestha, S., Grieder, J.A., McMahon, D.J., and Nummer, B.A., 2011, Survival of *Listeria monocytogenes* introduced as a post-aging contaminant during storage of lo.dw-salt cheddar cheese at 4, 10, and 21°C, *Journal of Dairy Science*, Vol, 94, No.9, p.4329-4335

- Shrestha, S., Grieder, J.A., McMahon, D.J., and Nummer, B.A., 2011, Survival of *Salmonella* Serovars introduced as a post-aging contaminant during storage of low-salt cheddar cheese at 4, 10, and 21 °C, *Journal of Food Science*, Vol.76, N.9.
- Schobitz, R., Marin, M., Horzella, M. y Carrasco, E., 2001, Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales, *Agro sur*, vol.29, no.2, p.114-119.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2016, Boletín de la leche. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/wp-content/uploads/boletinleche/B_de_Leche_enero-marzo_2016.pdf
- Secretaria de Salud, 2014, Boletín Epidemiológico, SNVE, No. 45, Vol. 31, Sem. 45, México.
- Solano-López, C., Hernández-Sánchez, H, 2000, Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of manchego and Chihuahua mexican cheeses, *International Journal of Food Microbiology*, 62, 149-153
- Soto- Beltran, M., Gerba, C.P., Porto-Fett, A., Luchansky, J.B., and Chaidez, C., 2014, Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from small mexican retail markets of queso fresco, *International journal of environment health research*
- Spahr, U. y Url, B., 1994. Behaviour of pathogenic bacteria in cheese - a synopsis of experimental data. *Bulletin of the IDF*, 298: 2 - 16.
- Tamplin, M. L., 2005, Chapter 7: Modeling pathogen behavior in foods, *Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology* p. 113-119

- Tassinari, M.B., Keizo-Yamazaki, A., Mendoca-Moraes, P., Nogueira-Vicosa, G. and Augusto-Nero, L., 2010, Microbiological Quality and Safety of Raw Milk and Soft Cheese and Detection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria with Antagonistic Activity Against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Spp., and *Staphylococcus aureus*, Foodborne Pathogens And Disease, Volume 7, Number 2, P. 175-180.
- Tindall, B.J., Grimont, P.A.D., Garrity, G.M., and J. P. E-uze, J.P., 2005, Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, p. 521–524
- Tejeda, T. F., 2004, Efecto del pH, salinidad y temperatura sobre la cinética de *Streptococcus pyogenes* en un medio de cultivo y su comportamiento en algunos alimentos y superficies, Tesis para obtener el grado en doctor en ciencias biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México.
- Tejedor, W., Ruiz, P., Rodrigo M. y Martínez, A., Microbiología predictiva, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Apartado de Correos 73, 46100 Burjassot, Valencia, España. Disponible en: http://www.asistenciatecnicaalcomercio.gov.co/docs/c93_modelos%20e%20inocuidad.pdf
- Torres-Vitela, M.R., Mendoza-Bernardo, M., Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C.A., Garay-Martínez, I.E., Navarro-Hidalgo, V., and Villarruel-López, A., 2012, Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and Staphylococcal Enterotoxin in Two Types of Mexican Fresh Cheeses, Journal of Food Protection, Vol. 75, No. 1, Pages 79–84
- U.S. Food and Drug Administration. 2015. Bacteriological Analytical Manual. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>. Consultado 27 de abril de 2015.
- Vela-Canales, I.L., 2012, Predicción de la vida útil de salchichas tipo viena en base al comportamiento de *Leuconostoc mesenteroides* bajo condiciones

inámicas de temperatura, tesis para obtener el grado de maestría en ciencia y tecnología de alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro.

Villegas, G. A. y Cervantes, E. F., 2011, La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos, Estudios. Soc., vol.19 no.38 julio/diciembre, México

Zeleny, R., Emteborg, H., Charoud-Got, J., Schimmel, H., Nia, Y., Mutel, I., Ostin, A., Herbin, S. and Hennekinne, J.A., 2015, Development of a reference material for *Staphylococcus aureus* enterotoxina A in cheese: Feasibility study, processing. Homogeneity and stability assessment. Food chemistry, V.168, p. 241-246.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M. and Van 'T Riet, K., 1990, Modeling of the Bacterial Growth Curve, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 56, No. 6, p. 1875-1881